



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONECTIVIDADE POPULACIONAL E A  
CONSERVAÇÃO DO MERO (*Epinephelus itajara*; PERCIFOMES:  
EPINEPHELIDAE) NA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL**

**EMILLY ANNY BENEVIDES**

**RECIFE  
2011**

**EMILLY ANNY BENEVIDES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONECTIVIDADE POPULACIONAL E A  
CONSERVAÇÃO DO MERO (*Epinephelus itajara*; PERCIFOMES:  
EPINEPHELIDAE) NA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo A. Torres

**RECIFE  
2011**

**EMILLY ANNY BENEVIDES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONECTIVIDADE POPULACIONAL E A  
CONSERVAÇÃO DO MERO (*Epinephelus itajara*; PERCIFOMES:  
EPINEPHELIDAE) NA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

APROVADA: 29 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Wagner Franco Molina - Membro externo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof<sup>o</sup>. Dr José Eduardo Garcia - Membro externo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Beatrice Padovani Ferreira - Membro externo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosangela Paula Teixeira Lessa - Membro interno (Suplente)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elisabeth de Araújo - Membro externo (Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho a todos que amo,  
que acreditaram em mim e sempre me  
apoiaram, assim como a mim mesma,  
pelo meu esforço e vontade de crescer  
independente dos obstáculos que são  
colocados à minha frente!*

## AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente... primeiramente agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo, por me guiar e proteger, colocando em meu caminho pessoas que tiveram grande envolvimento em meu trabalho, assim como nesta nova etapa da minha vida.

Aos meus pais, em especial a minha mãe Lúcia, aos meus irmãos Érik e Érika, e toda a minha enorme família. Agradeço pelo amor, incentivo, apoio e pela compreensão por tantos momentos de ausência.

Ao meu orientador Rodrigo A. Torres, pelo voto de confiança, pelos ensinamentos e orientação recebida, não esquecendo os puxões de orelha na hora certa. Você teve grande influência no meu “saber pensar e ser pesquisador”, sendo muito importante na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Ulisses Pinheiro, pelo incentivo a vir cursar o mestrado em Recife e por apresentar o meu futuro orientador!

As instituições e pesquisadores que forneceram as amostras teciduais para o desenvolvimento deste estudo, em especial a equipe envolvida no Projeto Meros do Brasil, liderada pelo Dr. Maurício Hostim-Silva. Muito obrigada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa concedida.

Aos meus colegas de Laboratório, agradeço muito pelos ensinamentos e experiências trocadas, pelas dicas, paciência, pelas discussões científicas e sugestões, não esquecendo os momentos de descontração, seja por um piada ou por um simples almoço juntos na SUDENE. Obrigada principalmente aos meus companheiros fiéis Filipe e Diego, não esquecendo o Guilherme, Ralph, Débora e Flávia.

A minha amiga Renata Félix e sua família, principalmente Duda, Nan e Cecília, por me fazerem sentir parte da família e literalmente me inserir nela... tendo grande importância nos meus primeiros caminhos nesta cidade e por abrir as portas da sua casa. Valeu pelo carinho, incentivo e abrigo. Muito Obrigada, não sei como seria se não fossem vocês!

À minhas amigas recifenses Façanha e Maíra. Obrigada pela amizade, pela compressão, por aguentarem meus choros, pelos conselhos dados, por não me deixarem sentir sozinha, pelas resenhas, pelas risadas e farras que ajudaram e

muito a desestressar quando eu estava mal. Vocês não fazem idéia de como foram importantes nessa caminhada.

A todas as pessoas que estiveram comigo nesta etapa: amigos que fiz, companheiros de apartamento, amigos do curso de inglês, colegas do mestrado, mestres e funcionários do CCB. Valeu!

Considerando que este trabalho é resultado de uma longa caminhada que não começou na UFPE, agradeço também a todas as pessoas que estiveram envolvidas na minha história acadêmica desde sempre, como os meus mestres e amigos da UESB.

As minhas amigas de coração e profissão, as biólogas Mari, Gi e Sílvia que estão trilhando o mesmo caminho que o meu só que em outros lugares, mas que continuam presentes. Mari valeu pela ajuda, tanto com artigos, revisões de texto, incentivos e sugestões. Obrigada por tudo!

Aos colegas de Congresso, principalmente dos EBIs da vida, valeu pelas experiências trocadas.

Aos amigos distantes, em especial Ingrid, pela sinceridade de uma amizade, aonde vimos que a distância não é suficiente para separar os amigos.

E por fim, agradeço a todos que contribuíram para meu sucesso e crescimento direta ou indiretamente. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Obrigada!

*"O mar é tudo. Ele cobre sete décimos do globo terrestre. Seu sopro é puro e saudável. É um deserto imenso, onde o homem jamais está sozinho, pois sente a vida se movimentando por todos os lados"*  
*Julio Verne*

## RESUMO

O Mero, *Epinephelus itajara*, é umas das espécies de peixes marinhos mais ameaçadas no Brasil e em todo planeta e o seu status de conservação é de "Criticamente em Perigo de Extinção" pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Neste estudo, objetivou-se avaliar a diversidade genética da espécie, assim como as relações entre as populações do mero de diversas localidades ao longo da sua distribuição. Para tal, foi acessada, por meio de marcadores moleculares nucleares de DNA do tipo *ISSRs* e de seqüências do genoma mitocondrial (citocromo b), a variação genética da espécie ao longo de 12 localidades do oceano Atlântico (Belize, Estados Unidos, Guiana Francesa, Pará, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia, São Paulo, Paraná e Santa Catarina) Nas análises de *ISSR*, foram analisados 95 exemplares de 10 localidades (Guiana Francesa, Pará, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia, São Paulo, Santa Catarina e Paraná). Oito primers *ISSR* foram selecionados e amplificaram 94 loci (variando de 250 a 1700bp) sendo 97% polimórficos. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 57% da variância total dos dados se encontra dentro das populações e 43% entre as populações. Os indivíduos de Santa Catarina são mais distantes geneticamente das demais localidades. A maior distância genética encontrada foi entre SC e Paraná (0,37) e a menor entre Pará e Guiana Francesa (0,10). A análise de agrupamento Bayesiano revelou um K=2 linhagens genético-evolutivas e as análises de agrupamento por Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) foram similares entre si, confirmando a presença destas duas linhagens de mero ao longo da costa Atlântica da América do Sul. Uma destas linhagens compreende a maior parte da amostragem de SC. A outra é composta pelos exemplares oriundos de todas as outras localidades, incluindo alguns poucos indivíduos de SC. Os resultados obtidos para *ISSRs* mostram pouca estruturação genético-geográfica para a maioria das localidades amostradas, à exceção do clado monofilético observado com aqueles exemplares de SC. Tal evidência é concordante com os agrupamentos (NJ, MP e agrupamento Bayesiano) e com os valores de distância genética e  $F_{ST}$ . A alta estruturação genético-evolutiva dos Meros de Santa Catarina (Baía da Babitonga, São Francisco do Sul) pode ser explicada pelo isolamento desta população, possivelmente pela retenção das larvas e/ou fixação reprodutiva de adultos na mesma região, já que parece não existir nenhuma barreira física que pudesse isolá-las geograficamente das outras regiões. Já os dados do genoma mitocondrial, revelam uma forte estruturação genético-evolutiva da população do estuário do rio Potengi (Natal, RN), igualmente sem aparente isolamento geográfico. A união dos dados oriundos das regiões nucleares com aqueles mitocondriais sugere que *Epinephelus itajara* apresenta um provável comportamento filopátrico em termos reprodutivos nos estuários da baía da Babitonga (SC) e do rio Potengi (RN), dada a estruturação genético-evolutiva observada. Além disso, é possível ainda hipotetizar que na baía da Babitonga (SC) machos e fêmeas são filopátricos, mas que no rio Potengi apenas as fêmeas parecem apresentar tal comportamento demográfico-reprodutivo. Tais hipóteses são sustentadas pelas características dos genomas acessados: *ISSRs* nucleares de origem biparental e genoma mitocondrial de origem uniparental.

Palavras-chave: 1 Serranidae. 2 genética de populações. 3 espécie ameaçada.

## ABSTRACT

*Epinephelus itajara*, commonly known as Goliath Grouper, is one of the most endangered marine fish species in Brazil and across the planet and its conservation status is "Critically Endangered" by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). This study aimed to analyze the genetic diversity of this species, as well as the connectivity patterns among Goliath Grouper populations from many sites along its distribution. Thus we accessed the genetic variation of Goliath Groupers from 12 locations in the Atlantic Ocean (Belize, United States, French Guiana, as well as the Brazilian states of Para, Piaui, Ceara, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia, Sao Paulo, Parana, and Santa Catarina) by using ISSR markers and mtDNA (cytochrome b). We analyzed 95 specimens from 10 sites (French Guiana, Para, Piaui, Ceara, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia, Sao Paulo, Parana, and Santa Catarina) by the ISSR markers. Eight ISSR primers were selected and they amplified 94 loci (ranging from 250 to 1700bp). Among these 94 loci 97% were polymorphic. However, it was verified that this value was biased by the high genetic distinctiveness hosting by those specimens from Santa Catarina (SC). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 57% of the total variance was within populations and 43% among populations. Individuals of Santa Catarina are more distant genetically from the other places. The largest genetic distance was found between SC and Parana (0.37) and the lowest between Para and French Guiana (0.10). The Bayesian clustering analysis revealed a  $K = 2$ . The genetic-evolutionary topologies obtained by Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Parsimony (MP) were strikingly similar among each other, confirming the presence of those two lineages of Goliath Grouper along the South American Atlantic coast. One of those lineages comprises the large part of the sample from SC. The other is comprised by specimens from all the other sites including few individuals from SC. The results from ISSRs show no spatial-based and or isolation by distance genetic-evolutionary structuring for most sampling sites, except for the monophyletic clade comprising by those specimens from SC. This evidence is in concordance with the clusterings observed (NJ, MP and Bayesian clustering), with the genetic distances, and  $F_{ST}$  values. The high genetic-evolutionary structuring shown by Goliath Groupers from Santa Catarina (Babitonga Bay, South San Francisco) might be explained by the isolation of this population, possibly due to retention of larvae and/or reproductive fixation of adults in the same region, since it does not seem to exist any physical barrier in which they could remain isolated from the other sites. Yet, the data from the mitochondrial genome revealed a strong genetic-evolutionary structuring in the population from estuary of the Potengi river (Natal, RN), also without apparent geographical isolation. The joint DNA datasets suggest that *Epinephelus itajara* probably presents a reproductive philopatric behavior in estuaries of the Babitonga Bay (SC) and Potengi river (RN), given the evolutionary genetic structuring observed. Furthermore, the results observed also indicate males and females to be philopatric at Babitonga Bay (SC) and just females as being philopatric at Potengi river. Such hypotheses are supported by features characterizing the accessed genomes: the biparental nature of nuclear ISSRs and the matrilineal origin of the mitochondrial genome.

Key-words: 1 Serranidae. 2 population genetics. 3 endangered specie.

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

- Tabela 1 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul .....26
- Tabela 2 – Primers *ISSRs* testados, suas respectivas sequências e temperatura de anelamento.....27
- Tabela 3 – Primers utilizados nas reações de PCR e seus respectivos resultados ..31
- Tabela 4 – Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *Epinephelus itajara*, em relação ao conjunto total de loci analisados.....32
- Tabela 5 – Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *Epinephelus itajara*, em relação ao conjunto total de loci presentes em cada localidade .....32
- Tabela 6 – Valores de distância geográfica (acima da diagonal em km) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.....33
- Tabela 7 – Análise de variância molecular para todas as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul .....37
- Tabela 8 – Análise de variância molecular para as populações de *Epinephelus itajara* divididas em dois grupos. Grupo 1: GF, PA, PI, CE, RN, PE, BA, SP, PR, Grupo 2: SC. ....38
- Tabela 9 – Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *Epinephelus itajara*.....39

### CAPITULO 2

- Tabela 1 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul para *ISSR*.....60
- Tabela 2 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul para *mtDNA* .....63

Tabela 3 – Primers utilizados nas reações de PCR e seus respectivos resultados. .64

Tabela 4 – Valores de distância geográfica (acima da diagonal em km) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul..... 64

Tabela 5 – Análise de variância molecular para as populações de *Epinephelus itajara* divididas em dois grupos. Grupo 1: GF, PA, PI, CE, RN, PE, BA, SP, PR, Grupo 2: SC ..... 68

Tabela 6 – Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *Epinephelus itajara*..... 69

Tabela 7 – Comparações  $F_{ST}$  par-à-par entre as amostras de *Epinephelus itajara*. (1) Pan, (2) PG, (3) Flo, (4) FG (5) Pa, (6) Pi, (7) Ce, (8) RN; (9) Ba, e (10) SC ..... 74

Tabela 8 – Comparações  $G_{ST}$  par-à-par entre as amostras de *Epinephelus itajara*. (1) Pan, (2) PG, (3) Flo, (4) FG (5) Pa, (6) Pi, (7) Ce, (8) RN; (9) Ba e (10) SC. .... 75

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

Figura 1 – Locais de amostragem das populações do Mero (*Epinephelus itajara*: em detalhe) ao longo da costa Atlântica da América do Sul .....30

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de ISSR 15) exemplificando os perfis ISSRs e o polimorfismo das bandas em *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Su .....36

Figura 3 - Regressão linear entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *Epinephelus itajara* estudadas na costa Atlântica da América do Sul.....38

Figura 4 – Topologia de Neighbor-Joinning (NJ) obtida entre os exemplares de *Epinephelus itajara* oriundos das localidades amostradas. As diferentes cores indicam tais localidades .....39

Figura 5 - Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações (K=2) para *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.....40

Figura 6 – Topologia de Máxima Parcimônia (MP) obtida entre os exemplares de *Epinephelus itajara* oriundos das localidades amostradas. As diferentes cores indicam tais localidades .....41

### CAPITULO 2

Figura 1 – Locais de amostragem das populações do Mero, *Epinephelus itajara*, ao longo da costa Atlântica da América do Sul .....59

Figura 2 - Mapa indicando os locais de amostragem na América Central e do Sul. Números de 1-10 indicam respectivamente: Panamá (Pan), Punta Gorda (PG, Belize), Florida (Flo, USA), Guiana Francesa (FG), Pará (Pa, Brasil), Piauí (Pi, Brasil), Ceará (Ce, Brasil), Rio Grande do Norte (RN; estuário do rio Potengi), Bahia (Ba, Brasil), e Santa Catarina (SC, Brasil) .....62

Figura 3 – Regressão linear entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *Epinephelus itajara* estudadas na costa Atlântica da América do Sul.....65

Figura 4 – Topologia de Neighbor-Joinning (NJ) obtida entre os exemplares de <i>Epinephelus itajara</i> oriundos das localidades amostradas. As diferentes cores indicam tais localidades .....	66
Figura 5 – Topologia de Máxima Parcimônia (MP) obtida entre os exemplares de <i>Epinephelus itajara</i> oriundos das localidades amostradas. As diferentes cores indicam tais localidades .....	67
Figura 6 – Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações (K=2) para <i>Epinephelus itajara</i> ao longo da costa Atlântica da América do Sul.....	68
Figura 7 – Topologia de NJ obtida à partir da análise das sequências de citocromo b .....	71
Figura 8 – Topologia de MP obtida à partir da análise das sequências de citocromo b .....	72
Figura 9 – Topologia de Máxima Verossimilhança (ML) obtida à partir da análise das sequências de citocromo b .....	73
Figura 10 – Ilha de São Francisco do Sul (SC) .....	77
Figura 11 – Agregação de <i>Epinephelus itajara</i> em São Francisco do Sul (SC) documentada em Dezembro de 2010 e observada pelo terceiro ano consecutivo na mesma região.....	77

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	15
------------------------	----

<b>CAPITULO 1 – GENÉTICA EVOLUTIVA, CONECTIVIDADE POPULACIONAL E A CONSERVAÇÃO DE <i>Epinephelus itajara</i> (PERCIFORMES: EPINEPHELIDAE) NA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL.....</b>	<b>19</b>
---	-----------

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
--------------------------	-----------

<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
-------------------------	-----------

2.1 Objetivo geral .....	24
--------------------------	----

2.2 Objetivos específicos .....	24
---------------------------------	----

<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
---------------------------	-----------

3.1 Material genético .....	25
-----------------------------	----

3.2 Extração de DNA genômico .....	26
------------------------------------	----

3.3 Reações de PCR- <i>ISSR</i> .....	26
---------------------------------------	----

3.4 Análise estatística dos dados.....	28
--	----

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
---------------------------	-----------

4.1 Reações PCR- <i>ISSR</i> .....	31
------------------------------------	----

4.2 Análises de Agrupamento .....	33
-----------------------------------	----

4.3 AMOVA e parâmetros populacionais .....	37
--	----

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
-------------------------	-----------

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
-------------------------	-----------

<b>CAPITULO 2 – EVIDÊNCIAS GENÉTICO-EVOLUTIVAS PARA UM COMPORTAMENTO FILOPÁTRICO DE <i>Epinephelus itajara</i> (PERCIFORMES: EPINEPHELIDAE) NO ATLÂNTICO SUL.....</b>	<b>54</b>
---	-----------

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>54</b>
--------------------------	-----------

<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>57</b>
---------------------------	-----------

2.1 <i>ISSR</i> .....	57
-----------------------	----

2.2 mtDNA.....	59
----------------	----

<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
---------------------------	-----------

3.1 <i>ISSR</i> .....	62
-----------------------	----

3.2 mtDNA.....	67
----------------	----

<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	85
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## INTRODUÇÃO GERAL

Um dos desafios mais interessantes na biologia evolutiva é averiguar os processos responsáveis pela variabilidade genética de populações distantes ou estreitamente relacionadas (PAMPOULIE et al., 2004), neste aspecto, o fluxo gênico constitui um dos principais processos que afetam a história evolutiva das espécies e sua estruturação genética (HAUSER; CARVALHO, 2008), pois pode determinar até que ponto cada população pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (SLATKIN, 1993).

No ambiente marinho, principalmente no que se refere ao grupo dos peixes, o fluxo gênico é facilitado pela dispersão larval por meio das correntes oceânicas (COWEN et al., 2006; 2007). Considerando que o ambiente marinho apresenta-se aparentemente homogêneo, espera-se que essas populações de peixes exibam pequenas taxas de mudanças evolutivas (HAUSER; CARVALHO, 2008). Entretanto, estudos recentes têm desafiado essas visões tradicionais avaliando a conectividade entre populações marinhas (COWEN et al., 2006, 2007; COWEN; SPOUNGALE, 2009; TREML et al., 2008) e escala espacial e temporal da diferenciação populacional (CONOVER et al., 2006; JORGENSEN et al., 2005). Tais abordagens indicaram que fatores como barreiras ambientais, comportamento reprodutivo, dispersão e os processos históricos geralmente são os responsáveis pela estruturação genética das populações.

Nesse contexto, a compreensão da estruturação e como esta encontra-se distribuída, assim como, o entendimento de suas relações evolutivas, é o principal objetivo dos estudos genéticos, principalmente quando se refere à conservação das espécies. Estes estudos são necessários para estabelecer planos de gestão que visem à conservação da biodiversidade, tendo em vista que a diversidade biológica envolve não somente a riqueza de espécies, mas também a variação genética intra-específica (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007).

A possibilidade do uso da informação contida no DNA mostrou-se uma ferramenta útil na caracterização da diversidade genética, biológica e conhecimento histórico evolutivo das espécies, abrindo uma nova perspectiva em estudos biológicos (SOLÉ-CAVA, 2001). A maioria dos estudos genéticos utiliza marcadores

moleculares para acessar a informação genética das espécies e diferentes marcadores foram desenvolvidos e são utilizados em diferentes abordagens metodológicas para detecção de dados genéticos, conforme o interesse de estudo (FRANKHAN et al., 2002, PEREZ-SWEENEY et al., 2004).

Os primeiros marcadores utilizados foram os marcadores enzimáticos, os quais se mostraram eficientes na identificação de bancos genéticos de peixes (UTTER, 1991). Em seguida, surgiram marcadores que utilizaram as informações contidas no DNA e, juntamente com o desenvolvimento da técnica de *PCR* (Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase), descrita por Kary Mullis em 1993 (SYKES, 2003), surgiu uma nova perspectiva em estudos biológicos. Assim, os marcadores moleculares passam a ser amplamente utilizados para avaliar a diversidade genética e elucidar relações genéticas e demográficas das populações, principalmente no que se refere ao entendimento da história evolutiva das espécies (AVISE, 1994, 2004). São vários os marcadores disponíveis para pesquisas nessa área, dentre estes destacam-se os marcadores ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*), que são ancorados no núcleo, e os marcadores do DNA mitocondrial (mtDNA), como por exemplo o citocromo b.

Marcadores ISSRs, representam uma das classes de marcadores moleculares e foram descritos inicialmente por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz et al. (1994). É um marcador de caráter dominante onde sua técnica envolve a utilização de sequências de microssatélites como ancoradouros para os seus *primers*, a fim de gerarem marcadores multiloci (REDDY et al., 2002). Algumas das vantagens desse tipo de marcador são que a amplificação não requerer informação prévia da sequência do genoma, conduz a padrões altamente polimórficos e garante a geração de dados à partir do genoma nuclear (SOUZA et al., 2008). Cada banda detectada corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos e as bandas visíveis são definidas como marcadores dominantes e determinadas para locos genéticos como dois alelos: 1 indica presença e 0 ausência (REDDY et al., 2002; WOLFE, 2005).

O uso da variação genética para marcadores ISSRs têm se mostrado bastante eficaz para estudos de história populacional e conectividade genética em diversos grupos animais (BUGARSKI-STANOJEVIĆ et al., 2011; CASU et al., 2009; CHATTERJEE et al., 2004; LUQUE et al., 2002; ROUX et al., 2007;). No grupo dos peixes, especialmente aqueles do ambiente marinho, o uso dessa classe de

marcadores tem revelado interessantes informações acerca de estudos de genética populacional, evidenciando dispersão de longa distância ligando populações entre oceanos ou forte estruturação entre elas, bem como diversidade filogenética (BAY et al., 2004; BERNARDI et al., 2001; BOWEN et al., 2001; DOMINGUES et al., 2006, 2008; GARBER et al., 2004; PUEBLA et al., 2008; SEKINO et al., 2004).

O DNA mitocondrial (mtDNA), assim como os ISSRs, é uma ótima ferramenta para a análise genética das espécies e populações (BROWN, 1985). As vantagens da utilização do mtDNA como marcador são amplas e devidas principalmente a facilidade de manipulação e isolamento, grande número de cópias por células, taxa de mutação relativamente rápida (cerca de 5 a 10 vezes mais rápida do que a taxa de mutação de um gene nuclear de cópia única) e sua presumida falta de recombinação, a qual resulta da herança uniparental, quase que invariavelmente materna (AVISE, 1994; FREELAND, 2005; MEYER, 1993). Uma das desvantagens do mtDNA é que sua herança uniparental pode indicar uma história populacional não completamente correta, uma vez que padrões de dispersão da espécie podem variar entre os sexos (FREELAND, 2005).

O mtDNA tem sido utilizado em diversos estudos evolutivos e populacionais em diversas espécies de peixes, gerando a construção de muitos primers universais para diferentes regiões do mtDNA (APOSTOLIDIS et al., 2009; BOWEN et al., 2006; PALUMBI et al., 2002; DOMINGUES et al., 2005; 2006; 2008; GARBER et al., 2004). Dos 37 genes que apresenta, o Citocromo b (Cit b) é provavelmente o mais bem estudado gene mitocondrial entre os peixes, permitindo inferências tanto em história evolutiva, por meio de filogenias no nível de espécies, quanto em estruturas ou divergências populacionais recentes (CRAIG et al., 2009; FARIAS et al., 2001; KULLANDER et al., 2010; MCCARTNEY et al., 2003; MEYER, 1993; PROSDOCIMO et al., 2008).

Tanto os ISSRs como os marcadores de mtDNA podem ser gerados e aplicados a diversos tipos de tecido, com a vantagem da amostragem não invasiva (NIELSEN et al., 2009), ou seja, sem sacrifício do indivíduo. Dessa forma estes marcadores se tornam importantes aliados nos estudos de espécies ameaçadas de extinção. Tendo em vista a importância do conhecimento da diversidade genética intra-específica, e das particularidades na distribuição populacional das espécies, o presente trabalho pretendeu acessar os dados genéticos de *Epinephelus itajara*, ao longo da costa Atlântica da América do Sul, visando entender as relações genético-

evolutivas da espécie, os possíveis padrões diferenciais de fidelidade reprodutiva e, a forma como tais fenômenos podem auxiliar na identificação de áreas prioritárias para conservação da espécie.

## CAPITULO 1

### GENÉTICA EVOLUTIVA, CONECTIVIDADE POPULACIONAL E A CONSERVAÇÃO DE *Epinephelus itajara* (PERCIFORMES: EPINEPHELIDAE) NA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL

#### 1 INTRODUÇÃO

A dispersão é definida como o movimento de saída de indivíduos do local de início de vida para ocupar outro ambiente, sendo uma das mais importantes características envolvidas na persistência e evolução das espécies (COWEN et al., 2007). No ambiente em que vivem as populações marinhas elas estão sujeitas a uma grande variedade de meios que permitam a dispersão dos indivíduos dentro e entre as populações (COWEN; SPONAUGLE, 2009). Acredita-se, nesse sentido, que a conectividade entre estas populações é fortemente determinada pelas correntes oceânicas (TREML et al., 2008; WATSON et al., 2010), visto que nas espécies marinhas a fase larval representa a fase de dispersão dominante (KINLAN et al. 2005; COWEN et al., 2007; COWEN; SPONAUGLE, 2009).

Diferentes espécies em ambientes distintos podem ser estruturadas dentro de um relativo fluxo de indivíduos, dependendo da sua história de vida, das características físicas do ambiente e da escala espacial e temporal em que esta se encontra (BECKER et al., 2007; MORA; SALE, 2002; PATTERSON; SWEARER, 2007). Na maioria das espécies marinhas, os adultos têm mobilidade restrita, enquanto que as larvas e ovos são planctônicas (COWEN et al., 2006; COWEN; SPONAUGLE, 2009). Dessa forma, detectar processos históricos em curso e de divergência populacional se torna mais difícil, com exceção das espécies com capacidade de dispersão limitada (BARBER et al., 2002; JONES et al., 2009).

A distribuição espacial da diversidade genética em ambientes aquáticos, assim como no ambiente terrestre, é principalmente gerada e mantida por barreiras à dispersão (GALARZA et al., 2009). A descontinuidade do habitat nos oceanos é

mais difícil de ser distinguida, enquanto que, as barreiras podem ser facilmente observadas em ambiente terrestre (THORROLD, 2006). Entretanto, sabe-se que características como redemoinhos e frentes oceanográficas, a topografia do fundo, a influência dos estuários e as barreiras climáticas podem evitar a dispersão de larvas pelágicas no oceano (BOWEN; GRANT, 1997; LESSIOS et al., 1999; PALUMBI, 1992; 1994; WEERSING; TOONEN, 2009), gerando diferenciação genética entre as populações.

Dessa forma, identificar os padrões geográficos de estrutura genética de uma espécie pode fornecer informações valiosas sobre a conectividade histórica e atual das populações (AVISE, 2000). A Identificação das barreiras é essencial para definir a escala de intercâmbio entre populações marinhas, incluindo a implementação de áreas para manejo e conservação das espécies (COWEN et al., 2006; PALUMBI, 2003). A forte ou fraca conectividade entre áreas implica que as populações locais podem depender de processos que ocorrem em outros lugares (ROBERTS, 1997), dificultando assim, a identificação da origem do recrutamento larval e dos locais de assentamento das larvas dispersantes (PINEDA et al., 2007).

Peixes marinhos parecem tender a apresentar um baixo grau de diferenciação genética (GRANT; BOWEN, 1998; WARD et al. 1994), pois possuem uma população altamente eficaz a produzir um grande número de larvas e ovos, com capacidade de dispersar através de grandes distâncias, limitando a divergência populacional e gerando interconexões entre as áreas (HOARAU et al., 2002; WIRTH; BERNATCHEZ, 2001). Entretanto, diversos estudos evidenciaram a existência de estruturação genética entre populações de peixes marinhos decorrentes de gradientes ambientais (GONZALEZ; ZARDOYA, 2007; LECOMTE et al., 2004), barreiras oceanográficas para a dispersão e distribuição desigual de habitats (GALARZA et al., 2009), por serem obstáculos ao fluxo gênico (LESSIOS; ROBERTSON, 2006; PATARNELLO et al., 2007), e adaptação genética local (WILLIAMS; OLEKSIK, 2008).

Nesse contexto, estudos de conectividade populacional apresentam-se como ferramentas úteis para investigação da variabilidade e do fluxo genético, permitindo uma percepção da história demográfica das populações, pressões seletivas agindo na variação genética e processos mutacionais que geram diversidade (FREELAND, 2005; CONRAD; HURLES, 2007). Tais fenômenos vêm tendo um papel crucial no desenvolvimento de estratégias de conservação, principalmente em espécies

altamente exploradas e ameaçadas de extinção, já que nessas espécies a pressão seletiva da pesca e juntamente com a destruição de habitats essenciais para o ciclo de vida, podem criar isolamento genético entre as populações (TAK-CHUEN; FERREIRA, 2006)

Os serranídeos são peixes marinhos carnívoros que habitam as águas tropicais e subtropicais do mundo inteiro e é um grupo composto por aproximadamente 475 espécies. Dentro deste, encontra-se a família Epinephelidae (anteriormente Serranidae), que possui 19 espécies citadas para o Brasil (MENEZES et al., 2003; CRAIG; HASTINGS, 2007). Garoupas do gênero *Epinephelus* são importantes economicamente e altamente valorizadas para alimentação e também para fins ornamentais (GOVINDARAJU; JAYASANKAR, 2004). *Epinephelus* spp. são importantes para a piscicultura e, cerca de 13 espécies já foram reproduzidos artificialmente (LEONG, 1998; TUCKER, 2000). Entretanto, essas espécies são extremamente vulneráveis à pesca e exploração excessiva, porque apresentam vida longa, crescimento lento, maturação tardia e formam agregações relativamente pequenas (<100 ind.) e com desova sazonal curta (SADOVY; EKLUND, 1999).

*Epinephelus itajara*, o mero, é a maior garoupa do Atlântico, habita águas rasas e costeiras das Américas, desde a costa leste da Flórida ao longo do Golfo do México, Mar do Caribe, sul do Brasil e África Ocidental (SMITH, 1971; HEEMSTRA; RANDALL, 1993; CRAIG et al., 2009). *E. itajara* foi relatada previamente a partir do Pacífico Leste Central, no entanto, análises moleculares recentes demonstraram que esta população trata-se de uma espécie-irmã, denominada *Epinephelus quinquefasciatus* (CRAIG et al., 2009).

O mero é igualmente uma espécie de vida longa (podendo viver mais de 37 anos) e atinge a maturidade sexual com aproximadamente 110-115 cm de comprimento total para machos e 120-135 cm para as fêmeas, com 5 a 8 anos de vida, e pode alcançar mais de 200 cm de comprimento e pesar até 455 kg (ROBINS et al., 1986; BULLOCK et al., 1992). Durante a época reprodutiva, a espécie forma agregações para desova e seu ciclo de vida inclui mudanças ontogenéticas no uso do habitat como larvas pelágicas em águas costeiras, dispersadas pelas correntes (FRIAS-TORRES, 2006). Os juvenis são tipicamente encontrados em águas rasas e em associação com estuário bem estruturado e os adultos ocupam áreas como naufrágios, fendas em rochas ou recifes de coral, numa profundidade entre 45-55m

(EKLUND; SCHULL, 2001; FRIAS-TORRES, 2006). Ambos, jovens e adultos, mostram alta fidelidade sazonal ao sítio reprodutivo, embora haja evidências de migrações de longa distância para os dois estágios de história de vida (GRAHAM, 2008; PINA-AMARGÓS; GONZÁLEZ-SANSON 2009).

Devido a suas características bioecológicas, aliada a pesca excessiva e a destruição do habitat estuarino, essencial para as fases iniciais do ciclo de vida (BULLOCK et al., 1992; FRIAS-TORRES, 2006), o mero é uma das espécies de peixes marinhos mais ameaçadas (TAK-CHUEN; FERREIRA, 2006). A espécie está incluída na Lista Vermelha da União Internacional para a Proteção da Natureza (IUCN) como espécie " criticamente em Perigo de Extinção " em um curto espaço de tempo. A pesca do mero está proibida desde 1990, em águas dos EUA e desde 1993 no Caribe (SADOVY; EKLUND, 1999). No Brasil, a proteção foi implementada em 2002, com a publicação da Portaria 121 entre várias instituições não governamentais e o IBAMA, que versa sobre a proibição para captura, pesca e comercialização de mero em todo território Nacional. Assim, durante este período, os estudos se tornam necessários para uma contínua avaliação do status de conservação e definição dos locais de manejo para a espécie.

Diversos estudos genéticos desenvolvidos com *E. itajara* demonstram a eficiência de marcadores moleculares auxiliando no entendimento da história populacional, conectividade genética e conservação da sua biodiversidade. Craig et al. (2009) avaliaram as relações genéticas de *E. itajara* oriundos do oceano Pacífico (Panamá), Caribe (Flórida, EUA e Punta Gorda, Belize) e Brasil (Caravelas, BA) com base na variabilidade genética mitocondrial. Esses autores verificaram a ocorrência de espécies crípticas no Atlântico e Pacífico, e a conexão genética entre os meros do Brasil e de Belize apesar de um distanciamento geográfico de mais de 1000 km. Dados mais recentes indicam que *E. itajara* apresenta pouca variabilidade genética perante a região do genoma mitocondrial de maior taxa de diferenciação, região controle do mtDNA (SILVA-OLIVEIRA et al., 2008).

Nenhum estudo com *E. itajara*, até o momento, foi realizado utilizando marcadores moleculares ancorados no núcleo, como os marcadores ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*). Já, evidências à partir do genoma mitocondrial têm confirmando a vulnerabilidade da espécie, bem como boa parte da sua história genealógica [(CRAIG et al. 2009; SILVA-OLIVEIRA et al., 2008; TORRES et al. (em preparação)]. Assim, poder testar o grau de vulnerabilidade da espécie

perante uma categoria de marcadores do DNA nuclear, permite o teste das hipóteses mitocondriais disponíveis.

Tal abordagem ainda permite valorizar o planejamento de conservação de *E. itajara*, uma vez que as relações genético-evolutivas à partir do genoma nuclear podem revelar cenários similares ou diferentes daqueles observados à partir do mtDNA. Portanto, revelar o cenário nuclear da variação genética dessa espécie vem de encontro à idéia de que o componente biológico mais importante a ser conservado é a variação genética dentro da espécie, além dos processos históricos relacionados ao panorama genético/evolutivo observado (MORITZ, 2002).

Em face dos cenários ecológico e genético apresentados, toda e qualquer iniciativa que venha contribuir no incremento dos conhecimentos sobre a biologia de *E. itajara*, se torna crucial para o planejamento de conservação da mesma. Dessa forma, a decisão por avaliar como a variabilidade genética nuclear do mero se relaciona historicamente ao longo de boa parte da sua distribuição geográfica, advém da idéia de que conexões genético-populacionais que se apóiam mutuamente podem traduzir uma evidência mais robusta e verossímil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.2 Objetivo Geral

Acessar a variação genética de *Epinephelus itajara* ao longo de sua distribuição na costa Atlântica da América do Sul utilizando marcadores nucleares.

### 2.3 Objetivos específicos

- Determinar o nível de variabilidade genética da espécie na região estudada;
- Localizar as regiões que retém mais ou menos variabilidade genética;
- Identificando o nível de fluxo genético que o mero apresenta ao longo das regiões estudadas;
- Determinar a quantidade de populações genéticas que de fato existem ao longo da região estudada e observar se existe algum padrão demográfico;
- Identificar se existem regiões doadoras/receptoras de larvas;
- Observar se existe algum cenário de descontinuidade filogenética da espécie na região;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Amostras teciduais de *E. itajara* de um total de 95 exemplares foram obtidas de dez localidades: Guiana Francesa(GF), Praia de Ajuruteua – Pará(PA), Estuário do Rio Parnaíba – Piauí(PI), litoral do Ceará(CE), Estuário do Rio Potengi – Rio Grande do Norte(RN), Estuário do Rio Formoso – Pernambuco(PE), Caravelas – Bahia(BA), São Vicente – São Paulo(SP), litoral do Paraná(PR) e São Francisco do Sul – Santa Catarina(SC) (TABELA 1 e FIGURA 1). Os tecidos obtidos da região da nadadeira, fígado, ou ainda músculo e foram armazenados em Etanol 96% com pureza para biologia molecular em temperatura de -20 °C.

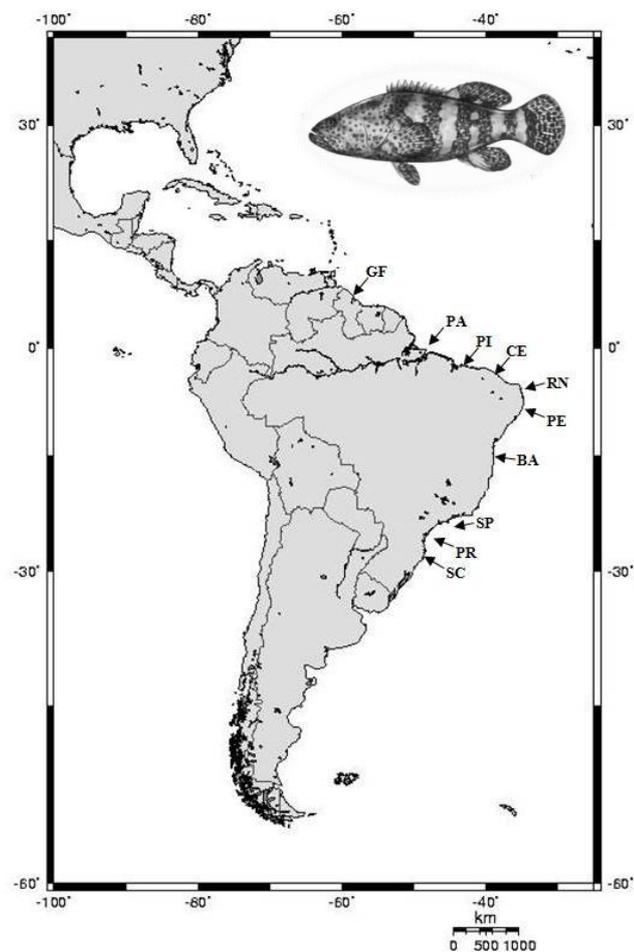


Figura 1 – Locais de amostragem das populações do Mero (*Epinephelus itajara*: em detalhe) ao longo da costa Atlântica da América do Sul

Tabela 1 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul

<b>LOCALIDADE</b>	<b>SIGLA</b>	<b>N</b>
Guiana Francesa	GF	17
Pará	PA	17
Piauí	PI	12
Ceará	CE	01
Rio Grande do Norte	RN	08
Pernambuco	PE	11
Bahia	BA	15
São Paulo	SP	02
Paraná	PR	01
Santa Catarina	SC	11
		<b>N= 93</b>

### 3.2 Extração de DNA genômico

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit de extração DNAEasy (QIAGEN) e o protocolo modificado de Fenol-Clorofórmio baseado no método escrito por Sambrook; Russel (2001). Após a extração, os DNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a integridade e pureza do material genético extraído. Em cada poço do gel foram colocados 3 µL de DNA, 1 µL de gel loading dye blue (6x) (tampão de carregamento) e 1 µL de Gel Green (0,5ml 10.000X em H<sub>2</sub>O) (corante de visualização do DNA), sempre acompanhados de uma série de concentrações conhecidas de DNA fago lambda (10, 25, 50 e 100 ng). Após eletroforese, a concentração de DNA foi estimada através da comparação visual das bandas do DNA do fago Lambda. Os géis foram fotodocumentados e arquivados. O DNA extraído, após quantificado, foi diluído a uma concentração padrão de 5ng/µL para utilização em reações de amplificação (PCR-ISSR).

### 3.3 Reação de PCR-*ISSR*

Primeiramente, 17 primers *ISSRs* de seqüências repetidas de di ou trinucleotídeos (específicas para seqüências de microssatélites) foram testados (Tabela 2) e escolhidos com base na reprodutibilidade e eficácia dos mesmos em outras espécies de peixes. Nesse teste, foram utilizados um ou dois exemplares de *Epinephelus itajara* de cada localidade amostrada nas reações de PCR. Dos 17 primers, oito foram selecionados por apresentarem a maior variação de loci polimórficos. Tal decisão partiu da orientação de Telles et al. (2001), que indica a estabilidade do desvio padrão sobre a variância, com base no uso de um número mínimo em torno de 60 loci polimórficos com pelo menos 6 primers.

Tabela 2 – Primers *ISSRs* testados, suas respectivas seqüências e temperatura de anelamento

<b>Primer</b>	<b>Seqüência 5' – 3'</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
<i>ISSR</i> 1	(AG)8T	50,4
<i>ISSR</i> 2	(AG)8C	52,8
<i>ISSR</i> 3	(GA)8T	50,4
<i>ISSR</i> 4	(GA)8C	52,8
<i>ISSR</i> 5	(CT)8G	52,0
<i>ISSR</i> 6	(AG)8YC	52,8
<i>ISSR</i> 7	(AG)8YA	54,0
<i>ISSR</i> 8	(GA)8YT	52,8
<i>ISSR</i> 9	(GA)8YC	52,8
<i>ISSR</i> 10	(GA)8YG	54,0
<i>ISSR</i> 11	(CT)8RA	50,0
<i>ISSR</i> 12	(AC)8YG	54,0
<i>ISSR</i> 13	(GGAC)3A	51,0
<i>ISSR</i> 14	(GGAC)3C	51,0
<i>ISSR</i> 15	(GGAC)3T	51,0
<i>ISSR</i> 16	(AACC)4	51,0
<i>ISSR</i> 17	(GGAC)4	51,0

As amplificações foram realizadas, seguindo os passos sugeridos por Almeida *et al.*, (2003). A solução de PCR (20 µl volume total) consistia em 1 unidade de Taq Dna Polimerase (New England/Biolabs), 2µL de solução tampão (10x), 0,5µL de MgSO<sub>4</sub> (20mM), 0,5µL de primer (50µM), 1,5 µL de dNTP (1,5mM) e 20ng de DNA genômico. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler e consistiram em 1 ciclo de 4min a 94 °C; 39 ciclos de 40s a 94 °C, 40s a °C (*primers* específico – Tabela 2) e 2min a 72 °C, com alongação final de 7min. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico.

Após a reação de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,8%, em cuba horizontal, contendo tampão TBE 0,5x, diluído de uma solução original de 10x (Tris 0,89M, Ácido Bórico 0,89M e EDTA 0,01M, pH= 8,3), por 4h a 60volts, onde, em cada poço do gel foram colocados um mix contendo 10 µL da reação de PCR, 1,5 µL de Gel Loading Dye Blue (6x) e 1,5 µL de Gel Green (0,5ml 10.000X em H<sub>2</sub>O). Para auxiliar na análise das bandas foi utilizado em um dos poços do gel, 2 µL do marcador DNA Ladder 1 Kb com 1,5 µL de Gel Loading Dye Blue (6x) e 1,5 µL de Gel Green. Os géis foram fotodocumentados em transluminador sob fonte de luz ultravioleta.

### 3.4 Análise estatística dos dados

A análise das imagens dos géis de agarose resultou em uma matriz binária (0/1), onde os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e à ausência (0) de bandas. Foram consideradas bandas homólogas todas que possuíam o mesmo tamanho e posição no gel estando estas nítidas e/ou fortemente coradas. Em seguida, a matriz foi submetida a uma mineração dos dados, na qual a matriz é explorada à procura de padrões consistentes, excluindo-se assim, elementos que enviesassem os dados.

Para determinação do patamar de variabilidade genética de *E. itajara* foram analisados o número de loci totais, o número de loci monomórficos e o número de loci polimórficos. Destes, foram calculados os percentuais de monomorfismo e polimorfismo globais e dentro de cada localidade, considerando o número de loci

totais como 100%. As localidades com menos de 5 indivíduos amostrados não foram discutidas nas análises de diversidade genética devido ao baixo tamanho amostral.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para observar a eventual estratificação da variância genética, além de possibilitar inferências a respeito da estruturação genética das mesmas (EXCOFFIER et al., 1992). Neste método, a matriz de distância entre todos os pares de genótipos é utilizada em um esquema de análise de variância hierarquizada, além de considerar a variação total observada como original de uma única população panmítica (EXCOFFIER et al., 1992). Essa análise ainda permite a estimativa do índice de fixação intraespecífica da diversidade genética ( $F_{ST}$ ), além do  $F_{CT}$  e  $F_{SC}$  para avaliar a proporção de variação entre grupos e entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. Para esta análise as dez populações foram analisadas e agrupadas de duas maneiras: todas em um único grupo e separadas em dois grupos. Foi utilizado o software ARLEQUIN .3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2010).

No tocante às análises de agrupamento, os dados foram analisados pelos métodos de distância [Neighbor-joining (NJ – SAITOU; NEI, 1987)] e máxima parcimônia (MP – FITCH, 1971), considerando em ambas as análises as espécies *Epinephelus morio* e *Mycteroperca marginata* como grupos externos. Tais análises foram desenvolvidas por meio do programa PAUP v.4.0b10\* (SWOFFORD, 2000), pela sua interface gráfica PaupUp v.1.0.3.1 (CALENDINI; MARTIN, 2005).

A Análise de Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) é um método de similaridade baseado em distância e no princípio da evolução mínima. O método não analisa todas as topologias possíveis, mas procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore (MIYAKI et al, 2001).

A análise de parcimônia foi conduzida por busca heurística. Todos os caracteres foram designados como não-ordenados, com o peso equivalente. A adição das OTUs – *Operational Taxonomic Units* - foi randômica e a sua permuta por meio do algoritmo tree-bisection-reconnection (TBR). Foi estabelecido um número máximo (MaxTrees) de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias. Foi ainda determinado o consenso estrito das árvores geradas. Para ambas as análises (distância e parcimônia) foram computados os índices de suporte dos ramos de Bootstrap e Jackknife, seguindo a regra de consistência dos ramos igual ou maior ao percentil 50, por meio da opção de busca fast stepwise addition, a partir de 1000 pseudo-réplicas. A adição das OTUs também foi randômica e a sua permuta

igualmente realizada por meio do algoritmo *tree-bisection-reconnection*. Todos os procedimentos supramencionados foram desenvolvidos por meio do uso dos softwares Paup\* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2000) e Nona v. 2.0 (GOLOBOFF, 2006). O uso deste último foi facilitado pela sua interface gráfica Winclada (NIXON, 2000).

A análise de Máxima Parcimônia é fundamentada na suposição de que a maior probabilidade de se recuperar a árvore que, de fato, representa a filogenia do grupo é escolher a topologia que pressupõe o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres (SWOFFORD; BERLOCHER, 1987). O método se baseia no princípio da homologia e assume que o critério de parcimônia leva ao maior número total de acertos da árvore verdadeira, quando se minimiza o número de passos evolutivos aceitos na árvore (MIYAKI et al, 2001).

Com os dados de distância genética par-a-par entre os indivíduos, fornecidos pelo NJ, foi construída uma matriz das médias da distância genética entre todos os indivíduos para as localidades estudadas. A partir desta, foi realizada uma regressão linear entre os dados obtidos de distância genética e distância geográfica entre todas as populações amostradas para observar a existência ou não de correlação entre estas distâncias por meio do software Statistica v.6.0 (Statsoft Inc.). A distância, em Km, foi estimada em linha reta entre as localidades amostradas ao longo do costa pelo uso da plataforma Google Earth.

Os parâmetros de genética populacional do tipo fluxo gênico ( $N_m$ =Número de migrantes por geração) e variabilidade genética inter-específica ( $G_{ST}$ ) globais e par-a-par, foram obtidos por meio do uso do software Popgen 1.32 (YEH et al, 1999).

Foram realizadas ainda estimativas de teste de estruturação populacional por meio do método Bayesiano, a fim de observar o possível número de K-populações genéticas (população homogênea ou heterogênea) por meio do software STRUCTURE 2.3.3 (FALUSH et al., 2003, 2007; HUBISZ et al., 2009; PRITCHARD et al., 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Reações PCR-ISSRs

Os dados obtidos a partir dos oito primers *ISSRs* utilizados, amplificaram um total de 94 loci que variaram de 250bp (pares de base) a 1700bp (Tabela 3 e Figura 2), sendo 92 polimórficos e 2 monomórficos, revelando assim uma diversidade genética global de 97,87% para *E. itajara* ao longo da região estudada.

Tabela 3 – Primers utilizados nas reações de PCR e seus respectivos resultados.

Primer	Sequência (5' – 3')	Ta°C	Faixa de tamanho das bandas	Nº de loci
ISSR 1	(AG)8T	50,4	1000 – 250	8
ISSR 3	(GA)8T	50,4	1300 – 350	17
ISSR 6	(AG)8YC	52,8	1300 – 300	11
ISSR 7	(AG)8YA	54,0	1500 – 400	13
ISSR 8	(GA)8YT	52,8	1000 -350	8
ISSR 10	(GA)8YG	54,0	750 – 250	11
ISSR 14	(GGAC)3C	51,0	1700 – 350	16
ISSR 15	(GGAC)3T	51,0	1600 – 400	10
				N= 94

Nota: Ta = temperatura de anelamento específica de cada primer.

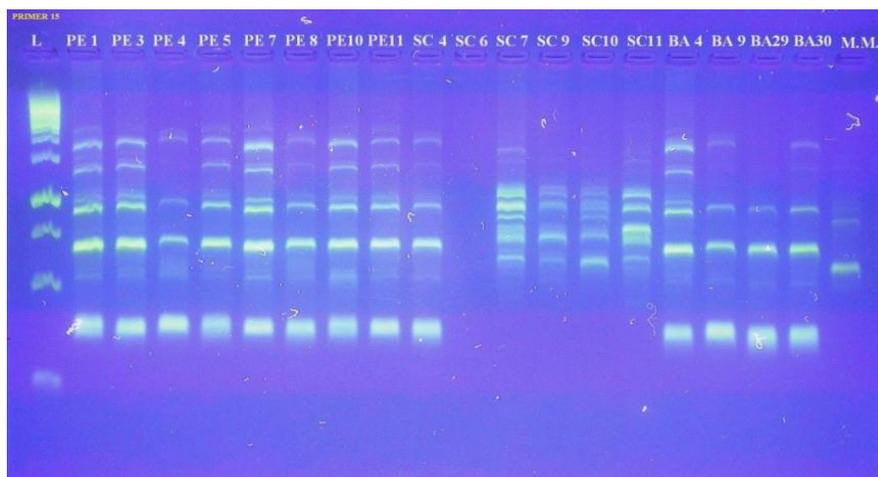


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de *ISSR* 15) exemplificando os perfis *ISSRs* e o polimorfismo das bandas em *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.

Nota: L= *Ladder*, Siglas representam indivíduos de diferentes localidades.

Fonte: a autora

A diversidade genética observada dentro de cada localidade em relação ao total da diversidade observada (Tabela 4) variou de 24,5% (PI) a 79,8% (SC). Enquanto que a diversidade genética das localidades em relação ao conjunto total de loci presente em cada localidade, variou de 32,9% (RN) a 94,9% (SC) (Tabela 5).

Tabela 4 – Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *E. itajara*, em relação ao conjunto total de loci analisados.

<b>Localidade</b>	<b>N</b>	<b>Nt</b>	<b>Nv</b>	<b>Dg(%)</b>
Guiana Francesa	17	94	34	36,2
Pará	17	94	32	34,0
Piauí	12	94	23	24,5
Ceará	1	94	0	0,0
Rio Grande do Norte	8	94	25	26,6
Pernambuco	11	94	27	28,7
Bahia	15	94	45	47,9
São Paulo	2	94	0	0,0
Paraná	1	94	0	0,0
Santa Catarina	11	94	75	79,8

Nota: N = n° de indivíduos; Nt = n° total de loci; Nv = n° de loci variantes; Dg = diversidade genética

Tabela 5 – Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *E. itajara*, em relação ao conjunto total de loci presentes em cada localidade.

<b>Localidade</b>	<b>N</b>	<b>Ntl</b>	<b>Nvl</b>	<b>Dg(%)</b>
Guiana Francesa	17	81	36	44,4
Pará	17	78	34	43,6
Piauí	12	76	28	36,8
Ceará	01	58	00	0,0
Rio Grande do Norte	08	70	23	32,9
Pernambuco	11	79	29	36,7
Bahia	15	82	43	52,4
São Paulo	02	64	00	0,0
Paraná	01	72	00	0,0
Santa Catarina	11	78	74	94,9

Nota: Ntl = n° total de loci presentes em cada localidade; Nvl= n° de loci variantes em cada localidade; Dg = diversidade genética

## 4.2 Análises de Agrupamento

### *Neighbor Joining (NJ)*

A análise de neighbor-joining revelou a existência de dois agrupamentos genéticos mais característicos, um agrupamento com baixo distanciamento genético entre elas, e SC, que formou um dos agrupamentos em separado do restante das localidades (Figura 3; Tabela 6). A topologia obtida ainda mostrou a ocorrência de algumas unidades genéticas individuais tais como as amostras oriundas do Piauí (PI) e Rio Grande do Norte (RN). Porém, no geral, as amostras estudadas apresentam variação genética compartilhada. As distâncias genéticas médias variaram de valores mínimos próximos de 0,12 até valores máximos próximos a 0,35. A menor distância genética observada foi entre os indivíduos do Pará e Guiana Francesa (0,1040) e a maior foi entre Santa Catarina e Paraná (0,3718).

A análise de regressão entre as médias de distância genética e a distância geográfica entre as localidades (Tabela 6 e Figura 4) indicou que não houve relação entre estas variáveis, apresentando um valor de  $R^2 = 0,034$ .

Tabela 6 – Valores de distância geográfica (acima da diagonal em km) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.

	PE	SP	SC	BA	PA	PI	GF	RN	CE	PR
PE	-	2188	2637	1080	1714	1118	2668	338	858	2452
SP	0,1177	-	449	1108	3902	3306	4856	2526	3046	264
SC	0,3297	0,3009	-	1557	4351	3755	5305	2975	3495	185
BA	0,1258	0,1622	0,2867	-	2794	2198	3748	1938	2458	1372
PA	0,1091	0,1328	0,3058	0,1306	-	596	954	1376	856	4166
PI	0,1672	0,1849	0,2957	0,1601	0,1429	-	1550	780	260	3570
GF	0,1146	0,1621	0,3021	0,1231	0,1040	0,1311	-	2330	1810	5120
RN	0,1591	0,2024	0,3001	0,1224	0,1469	0,1204	0,1322	-	520	2790
CE	0,1392	0,1484	0,2979	0,1419	0,1233	0,1280	0,1139	0,1185	-	3310
PR	0,1113	0,1355	0,3718	0,1789	0,1309	0,1774	0,1450	0,1879	0,1290	-

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

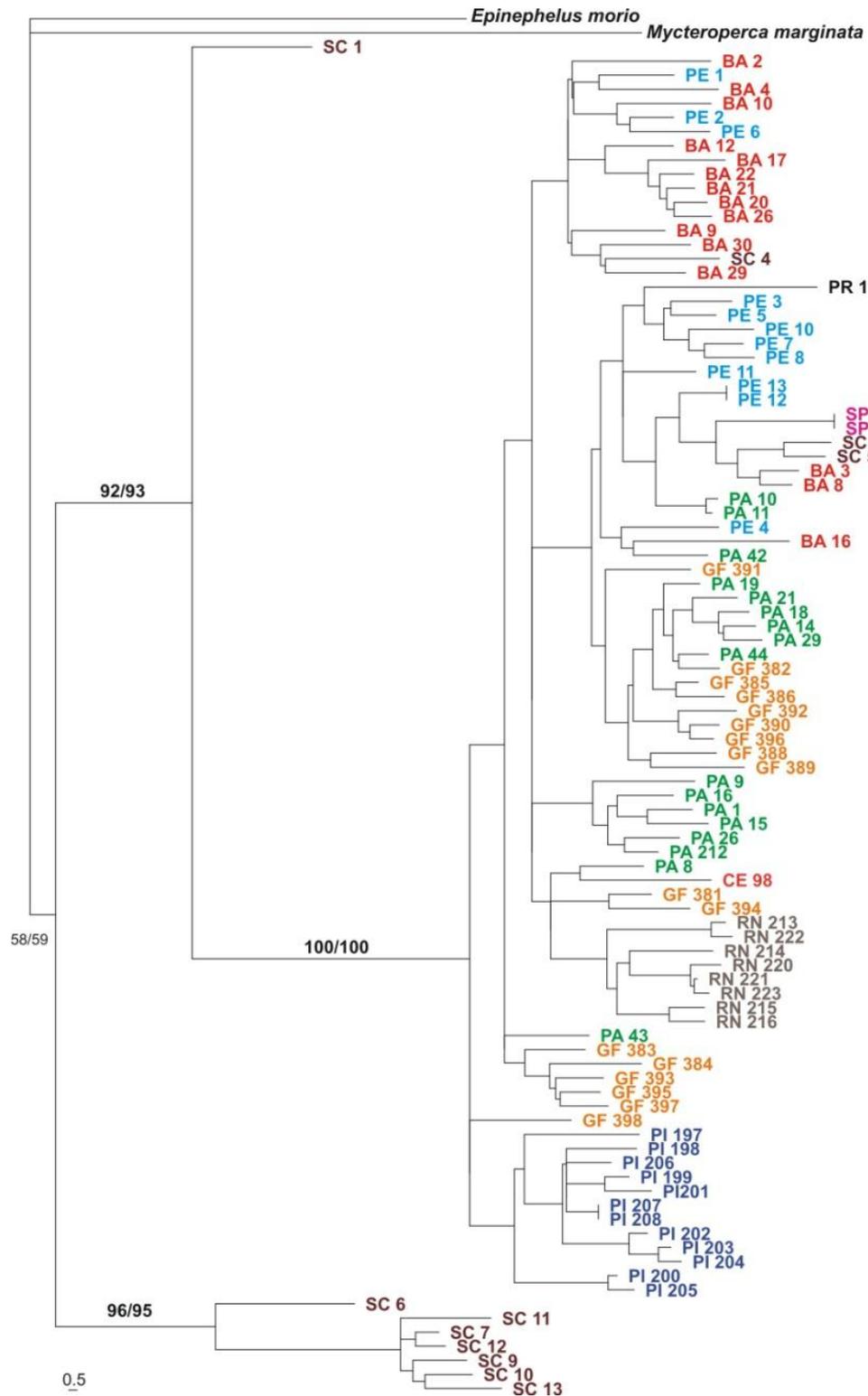


Figura 3 – Topologia de Neighbor-Joining (NJ) obtida entre os exemplares de *Epinephelus itajara* oriundos das localidades amostradas.

Nota: As diferentes cores indicam tais localidades. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos. Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

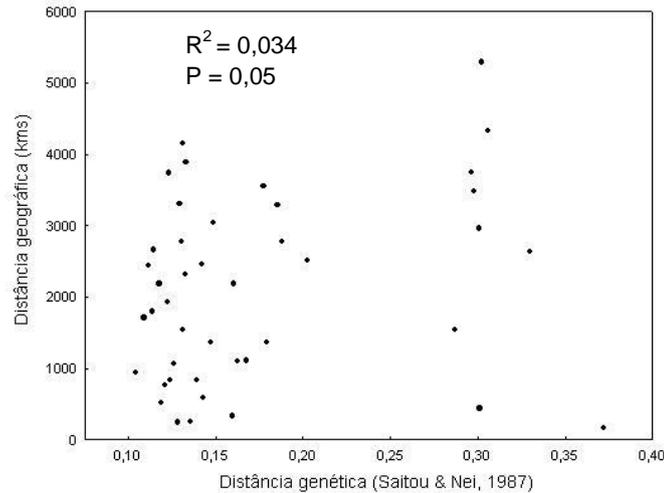


Figura 4 – Regressão linear entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas relativas (km) para as amostras de *Epinephelus itajara* estudadas na costa Atlântica da América do Sul

### *Máxima parcimônia*

A análise de parcimônia gerou um total de 25000 árvores igualmente parcimoniosas ( $L = 643$ ,  $Ci = 24$ ,  $Ri = 71$ ) à partir dos 95 caracteres. A análise de consenso (Consenso estrito) gerou uma topologia (Figura 5) com  $L(\text{número de passos}) = 685$ , índice de consistência ( $Ci$ )=22 e índice de retenção ( $Ri$ )= 69.

A topologia obtida (Figura 5) revelou dois grupos monofiléticos com alto suporte de ramos (Bootstrap/Jackknife) para *E. itajara*. Um ramo formado por indivíduos de Santa Catarina (SC) e o outro pelas outras populações amostradas, incluindo alguns indivíduos de SC.

É possível observar ainda, alguns pequenos agrupamentos monofiléticos, como por exemplo, o Piauí (PI) e Pará (PA). Entretanto, na topologia, em geral, a estruturação destes ramos não possui suporte estatístico.



### Análise Bayesiana (STRUCTURE)

Os resultados relativos ao teste de estruturação populacional pela análise Bayesiana revelou a existência de K= 2 populações genéticas (Figura 6).

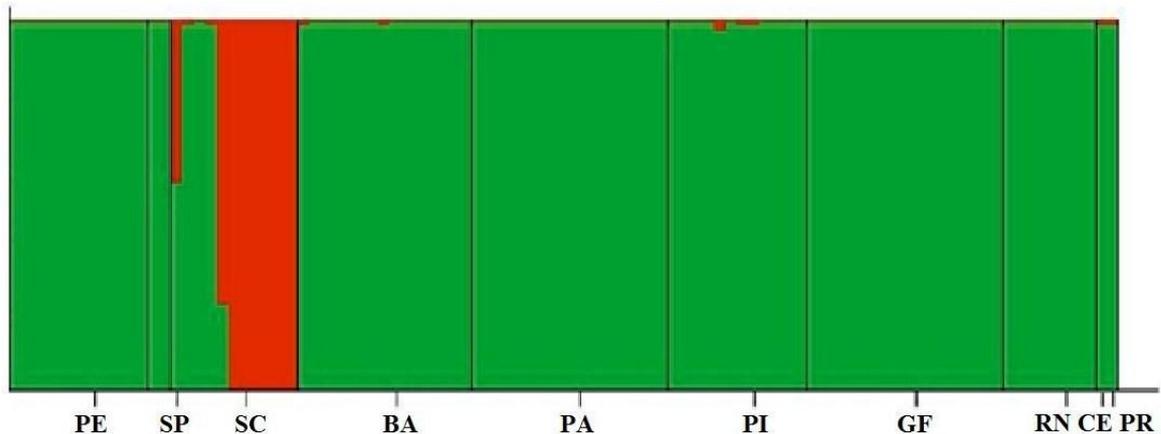


Figura 6 – Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações (K=2) para *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

#### 4.2 AMOVA e outros parâmetros de genética populacional

A análise de variância molecular (AMOVA) evidenciou que 57,28% da variação total encontra-se dentro das populações estudadas, e portanto, 42,72% entre as populações, com índice com índice  $F_{ST}$  global igual a 0,427 (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise de variância molecular para todas as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre as populações	9	540,762	5,70936 Va	42,72
Dentro das populações	86	658,447	7,65636 Vb	57,28
TOTAL	95	1199,208	13,36571	
Índice de fixação	$F_{ST}$	0,42716		

Nota: gl= graus de liberdade

A AMOVA foi realizada também para dois grupos, formados a partir das populações e baseado nas topologias obtidas, sendo o grupo 1 formado por GF, PA, PI, CE, RN, PE, BA, SP, PR e o grupo 2 por SC (Tabela 8). Nesta análise, o nível de variância genética entre os grupos foi de 43,65%, entre as populações dentro dos grupos de 18,18% e dentro dos grupos 38,17%. Tal análise evidenciou ainda os índices de fixação de  $F_{CT} = 0,436$ ,  $F_{SC} = 0,322$  e o  $F_{ST} = 0,618$ .

Tabela 8 – Análise de variância molecular para as populações de *Epinephelus itajara* divididas em dois grupos. Grupo 1: GF, PA, PI, CE, RN, PE, BA, SP, PR, Grupo 2: SC.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre os grupos	1	219,397	8,75411 Va	43,65
Entre as populações dentro dos grupos	8	321,365	3,64606 Vb	18,18
Dentro das populações	86	658,447	7,65636 Vc	38,17
TOTAL	95	1199,208	20,05653	
Índices de Fixação	$F_{SC}$	0,32259		
	$F_{ST}$	0,61826		
	$F_{CT}$	0,43647		

Nota: gl= graus de liberdade. Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

Os outros parâmetros de genética populacional apresentaram valores globais de 0,6628 e 0,2544, respectivamente para  $G_{ST}$  e  $Nm$ . Já, quando analisados de forma pareada entre as diferentes amostragens, foi observado que nenhuma das comparações apresentaram diferenciação genética insignificante ( $G_{ST} \leq 0.05$ ), 2,3% das comparações com pouca diferenciação genética ( $0.15 > G_{ST} > 0.05$ ), 11,2% das comparações com diferenciação genética moderadamente grande ( $0.25 > G_{ST} > 0.15$ ) e 86,5% com forte diferenciação genética ( $G_{ST} \geq 0.25$ ) (Para detalhes, consultar Nei, 1987 e Meirmans; Hedrick, 2011). Em termos mais detalhados, foram observadas variações entre 0 migrantes (SP em relação a CE e RN e entre CE e PR) e 2,933 migrantes entre PA e GF, no que se refere a fluxo gênico histórico ( $Nm$ ). Já, para os índices pareados de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) foram observadas variações desde 0,146 entre os exemplares PA e aqueles GF, até 1,000 entre a amostra SP e as amostras CE e RN e entre a amostragem CE e PR. Todos os dados encontram-se sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e Nm (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *Epinephelus itajara*.

	<b>PE</b>	<b>SP</b>	<b>SC</b>	<b>BA</b>	<b>PA</b>	<b>PI</b>	<b>GF</b>	<b>RN</b>	<b>CE</b>	<b>PR</b>
<b>PE</b>	-	0,556	0,512	0,240	0,229	0,461	0,238	0,431	0,593	0,577
<b>SP</b>	0,399	-	0,645	0,607	0,581	0,748	0,635	0,778	1,000	1,000
<b>SC</b>	0,476	0,275	-	0,406	0,467	0,510	0,459	0,509	0,624	0,696
<b>BA</b>	1,582	0,323	0,733	-	0,230	0,389	0,184	0,249	0,537	0,654
<b>PA</b>	1,683	0,360	0,571	1,672	-	0,363	0,146	0,371	0,514	0,613
<b>PI</b>	0,584	0,169	0,480	0,785	0,876	-	0,316	0,395	0,624	0,751
<b>GF</b>	1,599	0,287	0,590	2,218	2,933	1,084	-	0,280	0,455	0,617
<b>RN</b>	0,660	0,143	0,481	1,505	0,846	0,765	1,286	-	0,639	0,770
<b>CE</b>	0,344	0,000	0,301	0,430	0,472	0,301	0,599	0,283	-	1,000
<b>PR</b>	0,366	0,000	0,219	0,264	0,316	0,166	0,310	0,149	0,000	-

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

## 5 DISCUSSÃO

### *Diversidade genética*

Estudos genético-populacionais têm como principal objetivo avaliar e quantificar a variabilidade e estrutura genética entre indivíduos, dentro e entre espécies relacionadas ou populações, sendo os marcadores moleculares, os dados básicos para estes estudos (SOLÉ-CAVA, 2001; FAKRUDIN et al., 2006). Os marcadores ISSRs revelam-se ferramentas eficazes para resolver os problemas de genética de populações, sendo importante para acessar dados de variabilidade genética dessas entidades biológicas (LUQUE et al., 2002; HASSAN et al., 2003; CASU et al., 2005)

Baseado nos marcadores ISSRs aqui obtidos, *Epinephelus itajara* apresenta diversidade genética global muito alta (97,87%; TABELA 4). Entretanto, a diversidade genética observada dentro de cada localidade (TABELA 5) é de pouco mais de 50%, exceto para os indivíduos de Santa Catarina (SC), que apresentaram 94% de variação. Tais resultados sugerem que boa parte da diversidade global observada não reflete o potencial evolutivo da espécie, que apresentou um valor máximo mediano. Dado que a variação genética é a matéria prima da adaptação e, por conseguinte, da perpetuação da espécie, sugere-se, com base nos resultados aqui obtidos, que *Epinephelus itajara* na costa Atlântica encontra-se sob risco adaptativo. A análise da diversidade genética na espécie tem apontado baixo índice de variação, mesmo para setores genômicos com altas taxas de fixação mutacional (i.e. região controle do mtDNA; SILVA-OLIVEIRA et al., 2008). Portanto, a união dos dados da literatura com aqueles aqui obtidos apoiam o status de “criticamente ameaçado” de *E. itajara* sugerido pela IUCN.

A diversidade genética observada para a amostra SC (Santa Catarina) foi notável perante as outras localidades analisadas (TABELAS 4 e 5). Cabe sugerir que boa parte da alta diversidade observada nessa amostra esteja potencialmente relacionada a uma história populacional de isolamento genético perante as demais localidades, fixando variações genéticas independentes das demais. Todas as análises de agrupamento desenvolvidas, baseadas em premissas metodológicas

distintas, apoiam simultaneamente essa hipótese de isolamento genético, uma vez que destacam individualmente amostra SC das demais.

De acordo com as tabelas 4 e 5 é possível observar a variação da diversidade genética obtida. Assim, os menores valores observados foram para as amostras PI (36,8%; 24,5%) e RN (32,9%; 26,6%). Tais índices sugerem que essas localidades abrigam exemplares com o mais alto risco de extinção, perante o patamar de diversidade observada. Apesar de sua complexidade, as condutas de resgate ou restauração genética entre populações ou demes populacionais de espécies ameaçadas, vêm sendo uma das estratégias de conservação mais eficazes (JOHNSON et al., 2010; WIKRAMANAYAKE et al. 2011). Considerando tal estratégia, no tocante a uma possibilidade de resgate genético daquelas subpopulações de *E. itajara* com pouca diversidade genética (PI e RN), a amostra SC seria a menos indicada como doadora de variação, apesar da alta diversidade genética observada. Tal sugestão se sustenta na hipótese de isolamento genético da mesma, conforme mencionado acima. Uma eventual translocação de material genético da amostra SC para as outras, incrementaria a chance de depressão exogâmica pelo efeito da introgressão genética (para detalhes consulte FRANCKHAM et al., 2010).

### *Conectividade genético-evolutiva*

A análise de similaridade genética (NJ) revelou a existência de duas unidades genéticas em *Epinephelus itajara*, com forte respaldo estatístico das medidas de suporte de ramos de bootstrap e jackknife. Uma delas compreende a maior parte da amostragem SC e a outra é composta pelos exemplares oriundos das outras localidades com um grau maior e menor de relacionamento genético (Figura 3). Tais padrões de relações genéticas sugerem a conexão entre os demes populacionais acessados ao longo da área total estudada, indicando uma ampla população panmítica ao longo da área em questão, porém com forte tendência à sub-estruturação. Fenômenos de sub-estruturação genética já foram documentados em peixes tropicais marinhos do gênero *Epinephelus* (CHEN et al., 2008; KOEDPRANG et al., 2007; RHODES et al., 2003; SULAIMAN et al., 2008). Além disso, os dados de

$G_{ST}$  e  $N_m$  (Tabela 8) sustentam a hipótese de sub-estruturação, uma vez que 86,6% e 80% das possíveis comparações par-à-par apresentam respectivamente valores  $G_{ST} \geq 0,25$  e  $N_m < 1,0$ .

Por outro lado, a condição panmítica observada reforça a característica planctônica das larvas de *E. itajara* (SADOVY; EKLUND, 1999). Tal condição de panmixia aqui observada reforça a evidência de ocorrência de uma ampla população de *E. itajara* sugerida por meio de dados do genoma mitocondrial (CRAIG et al., 2009; TORRES et al., em preparação)

A análise filogenética pelo método de máxima parcimônia revelou a existência de dois grupos monofiléticos de *E. itajara* na costa atlântica da América do Sul, congruentes com as duas unidades genéticas observadas pela topologia de neighbor-joining. Os valores obtidos para bootstrap e jackknife reforçam a solidez destes dois grupos evolutivos (FIGURA 5). Tal evidência sustenta, na sua maior parte, a coesão evolutiva de *E. itajara* na área estudada, mas realça uma descontinuidade evolutiva da espécie no Atlântico Sul que se apresenta independente da distância geográfica com os outros demes acessados (FIGURA 4). Apesar da coesão evolutiva observada, *E. itajara* se revelou com fortes tendências à estruturações evolutivas e os dados relativos à AMOVA reforçam essa hipótese. Em ambas as estruturas testadas (TABELAS 6 e 7) os índices  $F_{ST}$ ,  $F_{CT}$  e  $F_{SC}$  sugerem forte estruturação evolutiva nos níveis global e regional, uma vez que todas os índices são muito superiores a 0,25, o que indica distanciamento evolutivo entre espécies diferentes (WRIGHT, 1951; HARTL; CLARK, 2010).

No tocante à descontinuidade filogenética observada de *E. itajara*, perante o agrupamento monofilético composto pela maior parte dos exemplares SC, uma interessante hipótese relativa à biodiversidade escondida parece se apresentar. Nesse sentido, especiação críptica vem se constituindo com um dos mais comuns fenômenos de diversidade biológica escondida, especialmente no grupo dos peixes. Cerca de 150 espécies crípticas de peixes foram reconhecidas entre 1978 e 2006 (PFENNINGER; SCHWENCK, 2007) e diversos exemplos especiação críptica em peixes Neotropicais marinhos e de água doce vêm sendo reportados (FRAGA et al., 2007; PIGGOTT et al., 2011; TORRES et al., 2005; TORRES; RIBEIRO, 2009; SANTOS et al., 2006). Portanto, a combinação dos dados aqui obtidos para amostra SC em relação às demais amostragens [distância e diversidade genética, análises de genética populacional e análises de agrupamento (similaridade, parcimônia e

bayesiana)] reforçam a hipótese de uma nova espécie críptica de mero nas águas do Atlântico subtropical, tal como *Epinephelus quinquefasciatus*, críptica de *E. itajara* do Pacífico tropical, na costa da Meso América (CRAIG et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. S. et al. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema River (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, Brazil, v.26, n.3, p.301-305. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v26n3/a14v26n3.pdf>>. Acesso em: 25 jan 2011.
- BARBER, P. H. et al. Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Molecular Ecology*, v.11, n.4, p.659–674. 2002. Disponível em: <<http://palumbi.stanford.edu/manuscripts/Barber%20et%20al%202002a.pdf>>. Acesso em: 25 jan 2011.
- BECKER, B. J. et al. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.104, p.3267-3272. 2007. Disponível em: <<http://levin.ucsd.edu/publications/2007Becker%20PNAS.pdf>>. Acesso em: 12 feb 2011.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology; Evolution*, v.22, n.3, p.148-155. 2007. Disponível em: <<http://www.kevinwinker.org/Bickford%20et%20al%202007%20TREE%20cryptic%20species.pdf>>. Acesso em: 18 mar 2011.
- BOWEN, B. W.; GRANT, W. S. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*, v.51, n. 5, p.1601-1610. 1997. Disponível em: <<http://www.jstor.org/pss/2411212>>. Acesso em: 13 dec 2010
- BULLOCK, L. H. et al. Age, growth, and reproduction of jewfish *Epinephelus itajara* in the eastern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*, v.90, n. 2, p. 243-249. 1992. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/age-growth-and-reproduction-of-jewfish-epinephelusitajara-in-the-eastern-gulf-of-mexico/>>. Acesso em: 12 jan 2011.
- CALENDINI, F.; MARTIN J. F. PaupUP v1.0.2032.22590 Beta. A free graphical frontend for Paup\* Dos software. 2005.
- CASU, M. et al. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.368, n.2, p.147-152. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098108004656>>. Acesso em: 4 apr 2011.

CHEN, S. et al. Genetic population structuring and demographic history of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) in South and East China Sea. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n.20, p.3554-3562. 2008. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/59371/47670>>. Acesso em: 7 nov 2010.

CONRAD, D. F.; HURLES, M. E. The population genetics of structural variation. *Nature Genetics Supplement*, v.39, p.30-36. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v39/n7s/abs/ng2042.html>>. Acesso em 4 june 2010.

COWEN, R. K. et al. Scaling of Connectivity in Marine Populations. *Science*, v.311, p.522–527. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/311/5760/522.full.pdf>>. Acesso em: 15 mar 2011

COWEN, R. K. et al. Population connectivity in marine systems. *Oceanography*, v.20, n.3, p.14–21. 2007. Disponível em: <[https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3\\_cowen\\_et\\_al.pdf?sequence=1](https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3_cowen_et_al.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 15 mar 2011.

COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, v.1, p.443–466. 2009. Disponível em: <[http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST\\_010809/Cowen\\_etal\\_2009.pdf](http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST_010809/Cowen_etal_2009.pdf)>. Acesso em: 15 mar 2011

CRAIG, M. T.; HASTINGS, P. A. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. *Ichthyological Research*, v.54, p.1-17. 2007. Disponível em: <<https://springerlink3.metapress.com/content/17845526110k0757/resource-secured/?target=fulltext.pdf&sid=ke1c4zxtpezqwljhotexkxsm&sh=www.springerlink.com>>. Acesso em: 12 feb 2011.

CRAIG, M. T. et al. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*, v.7, p.167-174. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2008/theme/Goliath/goliathpp1.pdf>>. Acesso em: 5 may 2011.

EXCOFFIER, L. et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491. 1992. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/131/2/479.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 may 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x/pdf>>. Acesso em: 13 may 2010.

EKLUND, A. M.; SCHULL, J. A stepwise approach to investigating the movement patterns and habitat utilization of goliath grouper, *Epinephelus itajara*, using conventional tagging, acoustic telemetry and satellite tracking. In: Sibert, J. R., NIELSEN, J. L. (eds) *electronic tagging and tracking in marine fisheries*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.189–216. 2001. Disponível em: <[http://www.sefsc.noaa.gov/sedar/download/SEDAR23\\_RD\\_05\\_Eklund\\_Schull\\_2001.pdf?id=DOCUMENT](http://www.sefsc.noaa.gov/sedar/download/SEDAR23_RD_05_Eklund_Schull_2001.pdf?id=DOCUMENT)>. Acesso em: 20 jan 2011.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked Loci and correlated allele frequencies. *Genetics*; v. 164, p.1567–1587. 2003. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/164/4/1567.full.pdf+html>>. Acesso em: 9 jan 2011.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, v.4, n.7, p.574–578. 2007. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/publications/FalushEtAl07.pdf>>. Acesso em: 17 may 2010.

FAKRUDIN, B. et al. DNA. DNA-based marker systems and their utility in entomology. *Entomologica Fennica*, v.17, p.21-33. 2006. Disponível em: <<http://direct.bl.uk/bld/PlaceOrder.do?UIN=184100743&ETOC=RN&from=searchengine>>. Acesso em 15 mar 2010.

FITCH, W. M. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, v.20, p.406-416. 1971. Disponível em: <<http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1987/A1987H855200001.pdf>>. Acesso em: 23 nov 2010.

FRAGA, E. et al. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae; Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology*, v.23, n.5, p.598-604. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0426.2007.00911.x/pdf>>. Acesso em: 30 jan 2011.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, v.143, p.1919–1927. 2010. Disponível em: <[http://extras.ufg.br/uploads/102/original\\_Frankham\\_2010.pdf](http://extras.ufg.br/uploads/102/original_Frankham_2010.pdf)>. Acesso em: 14 July 2010.

FREELAND, J. R. *Molecular Ecology*. John Wiley; Sons Ltd, West Sussex, 2005. 388p. Disponível em: <<http://mirror.lib.unair.ac.id/bahan/EFOLDER/Molecular%20Ecology.pdf>>. Acesso em: 10 oct 2009.

FRIAS-TORRES, S. Habitat use of juvenile goliath grouper *Epinephelus itajara* in the Florida Keys, USA. *Endangered Species Research*, v.2, p.1–6. 2006. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2006/2/n002p001.pdf>>. Acesso em: 5 sept 2010.

GALARZA, J. A. et al. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.106, n.5, p.1473-1478. 2009. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/106/5/1473.full.pdf+html>>. Acesso em: 3 june 2010.

GOLOBOFF, P. A. *Nona* v. 2.0. 2006. Disponível em: <<http://www.cladistics.com/nona.htm>>. Acesso em: 23 jan 2011.

GONZALEZ, E.; ZARDOYA, R. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology*, v.7, p.197. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2204010/>>. Acesso em 2 june 2010.

GOVINDARAJU, G. S.; JAYASANKAR, P. Taxonomic relationship among seven species of groupers (genus *Epinephelus*; family Serranidae) as revealed by RAPD fingerprinting. *Marine Biotechnology*, v.6, n.3, p.229-237. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136913>>. Acesso em: 12 mar 2010.

GRAHAM, R. T. et al. Characterization of the goliath grouper *Epinephelus itajara* fishery of southern Belize for conservation planning. *Endangered Species Research*, v.7, p.195-04. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2009/7/n007p195.pdf>>. Acesso em: 4 mar 2011.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, v.89, p.415-426. 1998. Disponível em: < <http://jhered.oxfordjournals.org/content/89/5/415.full.pdf+html>>. Acesso em: 2 dec 2010.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Princípios de Genética de Populações*. 4. Ed. 2010. ArtMed.Porto Alegre-RS, Brazil, 2010. 660p.

HASSAN, M. et al. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 291, p.219–232. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098103001394>>. Acesso em: 31 jan 2011.

HEEMSTRA, P. C.; RANDALL, J. E. FAO species catalogue. vol. 16. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. *FAO Fisheries Synopsis no. 125*, FAO. Rome, 1993.

HOARAU, G. et al. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology*, v.11, p. 1165-1176. 2002.

HUBISZ; M. J. et al. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, v.9, p.1322-1332. 2009. Disponível em: <<http://stephenslab.uchicago.edu/MSpapers/Hubisz2009.pdf>>. Acesso em: 15 fev 2011.

JOHNSON, W. E. et al. Genetic restoration of the Florida panther. *Science*, v.329, n. 5999, p.1641-1645. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/329/5999/1641.full.pdf>>. Acesso em 11 fev 2011.

JONES, G. P. et al. Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes. *Coral Reefs*, v.28, p.307-325. 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/41452521517n0041/fulltext.pdf>>. Acesso em: 3 oct 2010.

KINLAN, B. P. et al. Propagule dispersal and the scales of marine community process. *Diversity and Distributions*, v.11, p.139–148. 2005. Disponível em: <<http://escholarship.org/uc/item/0cn6r4kr>>. Acesso em: 9 nov 2009.

KOEDPRANG, W. et al. Evaluation of genetic diversity of eight grouper species *Epinephelus* spp. based on microsatellite variations. *Fisheries Science*, v. 73, n.2, p.227–236. 2007. Disponível em: <<http://www.aseanbiodiversity.info/Abstract/53006178.pdf>>. Acesso em: 15 oct 2010.

LECOMTE, F. et al. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology*, v.13, p.2169–2182. 2004.

LEONG, T. S. Grouper culture. In: De Silva S. S. (ed.). *Tropical Mariculture*. Academic Press, Toronto, 1998. p.381–448.

LESSIOS, H. A. et al. Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*, v.53, p.806–817. 1999.

LESSIOS, H. A.; ROBERTSON, D. R. Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proceedings of the Royal Society B*, v.273, p.2201–2208. 2006. Disponível em: < <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/273/1598/2201.full.pdf+html> >. Acesso em: 22 jan 2011.

LUQUE, C. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, v.136, n.3, p.251–253. 2002.

MENEZES, N. A. et al. *Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

MIYAKI, C. Y. et al. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: *Biologia Molecular e Evolução*. MATIOLI, S. R. Editora Holos, Riberão Preto-SP, 2001. p.97-107.

MORA, C.; SALE, P. F. Are populations of coral reef fish open or closed?. *Trends in Ecology and Evolution*, v.17, n. 9, p.422-428. 2002. Disponível em: < <http://faculty.bennington.edu/~sherman/the%20ocean%20project/reef%20fish%20pops%20open%20or%20closed.pdf> >. Acesso em: 2 feb 2011.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, v.51, n.2, p.238-254. 2002.

NIXON, K. C. Winclada v.0.9.99m24. 2000. Disponível em: <<http://www.cladistics.com/winclada.htm>>. Acesso em: 3 feb 2010.

PALUMBI, S. R. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*, v.7, n.4, p.114-118. 1992.

PALUMBI, S. R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 25: 547–572. 1994. Disponível em: < <http://palumbi.stanford.edu/manuscripts/Palumbi%201994.pdf> >. Acesso em: 5 mar 2010.

PALUMBI, S. R. Population genetics, demographic connectivity and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13: 146–158. 2003. Disponível em: <[www.vliz.be/imisdocs/publications/54504.pdf](http://www.vliz.be/imisdocs/publications/54504.pdf)>. Acesso em: 5 mar 2010.

PATARNELLO, T. et al. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, v.16, p.4426–4444. 2007. Disponível em: <[www.vliz.be/imisdocs/publications/130988.pdf](http://www.vliz.be/imisdocs/publications/130988.pdf)>. Acesso em: 5 mar 2010.

PATTERSON, H. M.; SWEARER, S. E. Long-distance dispersal and local retention of larvae as mechanisms of recruitment in an island population of a coral reef fish. *Austral Ecology*, v.32, p.122-130. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-9993.2006.01669.x/pdf>>. Acesso em: 20 feb 2011.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*, v.7, p.121. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-7-121.pdf>>. Acesso em: 20 feb 2011.

PIGGOTT, M. P. et al. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.102, n.2, p.391-403. 2011.

PINA-AMARGÓS, F.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G. Movement patterns of goliath grouper *Epinephelus itajara* around southeast Cuba: implications for conservation. *Endangered Species Research*, v.7, p.243–247. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2009/7/n007p243.pdf>>. Acesso em: 13 may 2011.

PINEDA, J. et al. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, v.20, n.3, p.22–39. 2007. Disponível em: <[https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2784/20.3\\_pineda\\_et\\_al.pdf?sequence=1](https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2784/20.3_pineda_et_al.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 7 feb 2010.

PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945–959. 2000. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/155/2/945.full.pdf>>. Acesso em 12 jan 2011.

RHODES, K. L. et al. Genetic structure of camouflage grouper, *Epinephelus polyphkadion* (Pisces : Serranidae), in the western central Pacific. *Marine Biology*, v.142, p.771–776. 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/eef3hv7dea7x6h0/>>. Acesso em: 25 aug 2010.

ROBERTS, C. M. Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science*, v.278, p.1454–1457. 1997.

ROBINS, C. R et al. *A field guide to Atlantic coast fishes of North America*. Houghton Mifflin, Boston, MA, 1986.

SADOVY, Y.; EKLUND, A. Synopsis of Biological Data on the Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, and the Jewfish, *E. itajara*. *NOAA Tech Rep*, 1999. 65p.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, n.4 p.406-425. 1987. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.full.pdf>>. Acesso em: 13 may 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 2001.

SANTOS, S. et al. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular ecology*, v.15, p.4361-4373. 2006.

SILVA-OLIVEIRA, G. C. et al. Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper (*Epinephelus itajara*, Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, n.4, p.988-994. 2008.

SMITH, C. L. (1971). A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera. *American Museum of Natural History*, v.146, p.69–241. 1971. Disponível em: <<http://digitallibrary.amnh.org/dspace/handle/2246/1166>>. Acesso em: 30 oct 2010.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Ribeirão Preto, 2001. p.172-192.

SULAIMAN, Z. H. et al. Genetic population structure of red snapper (*Lutjanus malabaricus*) and orange-spotted grouper (*Epinephelus coiodes*) in Brunei and Sabah. *Integrative Zoology*, v.3, p.208–215. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-4877.2008.00098.x/pdf>>. Acesso em: 25 oct 2010.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Vers. 4. Sinauer, Sunderland, MA., 2000.

SWOFFORD, D. L.; BERLOCHER, S. H. Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Systematic Zoology*, v.36, p.293-325. 1987. Disponível em: <<http://sysbio.oxfordjournals.org/content/36/3/293.full.pdf+html>>. Acesso em: 21 may 2010.

TAK-CHUEN, C.; FERREIRA, B. P. *Epinephelus itajara* - IUCN Red List of Threatened Species, 2006. In: *IUCN Red List of Threatened Species*. 2010. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 15 aug. 2011.

TELLES, M. P. C. et al. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.2, n.2, p.87-95. 2001.

THORROLD, S. R. Ocean Ecology: Don't Fence Me in. *Current Biology*, v.16, n. 16, p.638-640. 2006. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272099&\\_user=10&\\_pii=S0960982206019014&\\_check=y&\\_coverDate=2006-08-22&view=c&\\_gw=y&wchp=dGLzVlt-zSkzk&md5=1c6fa6ac4d0a34e43a20857674c8bae1/1-s2.0-S0960982206019014-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272099&_user=10&_pii=S0960982206019014&_check=y&_coverDate=2006-08-22&view=c&_gw=y&wchp=dGLzVlt-zSkzk&md5=1c6fa6ac4d0a34e43a20857674c8bae1/1-s2.0-S0960982206019014-main.pdf)>. Acesso em: 2 mar 2010.

TORRES, R. A.; RIBEIRO, Juliano The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia*, v.617, p.157-170. 2009.

TORRES, R. A. et al. Surprising genomic diversity in the Neotropical fish *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): how many species? *Neotropical Ichthyology*, v.3, n.2, p.277-284. 2005.

TUCKER, J. W. Jr. *Grouper culture*. In: Encyclopedia of Aquaculture, STICKNEY, R. R. (eds.). Wiley-Interscience, New York, 2000. p.418–421.

WANG, H. The problems and situation in the artificial propagation of grouper, *Epinephelus*. *Journal of Dalian Fisheries College*, v.12, n.3, p.44–51. 1997.

WARD, R. D.; GREWE, P. M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fishereis*, v.4, n.3, p.300-325. 1994. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k084583427u10442/>>. Acesso em: 15 june 2010.

WATSON, J. R. et al. Realized and potential larval connectivity in the Southern California Bight. *Marine Ecology-Progress Series*, 401: 31-48. 2010.

WEERSING, K.; TOONEN, R. J. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, v.393, p.1-12. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/feature/m393p001.pdf>>. Acesso em: 12 jan 2011.

WIKRAMANAYAKE, E. et al. A landscape-based conservation strategy to double the wild tiger population. *Conservation Letters*, v.4, p.219–227, 2011.

WILLIAMS, L. M.; OLEKSIK, M. F. Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *BMC Evolutionary Biology*, v.8, p.282. 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-8-282.pdf>>. Acesso em: 15 nov 2010.

WIRTH, T.; BERNATCHEZ, L. Genetic evidence against panmixia in *European eel*. *Nature*, v.409, p.1037-1040, 2001.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics*, v.15, n.37, p.313-354. 1951.

YEH, F. C. et al. *Popgene version 131: microsoft window based freeware for population genetic analysis*. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999. 29p.

## CAPITULO 2

### EVIDÊNCIAS GENÉTICO-EVOLUTIVAS PARA UM COMPORTAMENTO FILOPÁTRICO DE *Epinephelus itajara* (PERCIFORMES: EPINEPHELIDAE) NO ATLÂNTICO SUL

#### 1 INTRODUÇÃO

A conectividade populacional no ambiente marinho geralmente se refere à “ligação demográfica entre populações, impulsionada pela dispersão de larvas, juvenis ou adultos” (SALE et al., 2005). Esta é determinada principalmente pela mobilidade do organismo, presença de barreiras físicas ou ecológicas, características comportamentais, padrões de dispersão e eventos demográficos que podem impedir o fluxo gênico e a deriva por distância geográfica entre as populações (COWEN; SPONAUGLE, 2009). Com base nisso, as populações podem ser classificadas em fechadas, quando possuem ausência de conectividade apresentando alta estruturação genética, e em populações abertas, quando a conectividade é alta e em consequência a população apresenta-se geralmente homogênea (COWEN et al., 2007; MORA; SALE, 2002).

As correntes oceânicas são um dos principais fatores que conectam as populações no ambiente, dispersando larvas e ovos por longas distâncias (COWEN et al. 2006; 2007; COWEN; SPONAUGLE, 2009; TREML et al., 2008; WATSON et al., 2010). Entretanto, sistemas de correntes locais podem atuar como barreira, retendo os dispersantes e impedindo o fluxo gênico (COWEN; SPONAUGLE, 2009; GALARZA et al., 2009). Outros fatores ambientais tais como barreiras geográficas e climáticas, incluindo a topografia do fundo, influência dos estuários e zonas de descontinuidade do habitat, funcionam como barreiras ao fluxo gênico, sugerindo que o ambiente marinho apresenta uma certa heterogeneidade ambiental tendo efeitos profundos na conectividade das populações e gerando assim estruturação populacional em populações abertas (MORA; SALE, 2002; PALUMBI, 1992; WEERSING; TOONEN, 2009). Aliado a isso, em espécies que sofrem com a pesca seletiva e são diretamente afetadas pela destruição de habitats, estes podem

constituir também como barreiras ao fluxo gênico, contribuindo para aumentar a vulnerabilidade em espécies ameaçadas (TAK-CHUEN; FERREIRA, 2006).

Além dos fatores de história de vida e barreiras ambientais, o “homing” natal ou filopatria (tendência para que os indivíduos reproduzam nos locais onde nasceram), constitui uma barreira comportamental que pode reduzir o fluxo gênico (STEPIEN; FABER, 1998). Esses fatores, juntamente com a seleção de um habitat de desova contribuem significativamente para a estruturação de uma população (BERGEK et al., 2010).

Estudos de filopatria são bem documentados em diversos grupos animais, com destaque no estudo de aves migratórias (WEIMERSKIRCH; WILSON, 2000), tartarugas marinhas (BOWEN et al., 2005) e morcegos Neotropicais (MARTINS et al., 2007). Entre os peixes, as espécies que migram por longa distância, como o salmão, são os mais estudados (KING et al., 2001). Na região Neotropical *Pseudoplatystoma corruscans* (Pimelodidae) é um dos mais recentes exemplos da investigação das feições genéticas de espécies exploradas. A espécie demonstrou uma forte estruturação genético-populacional ao longo dos ambientes amostrados, sugerindo um comportamento filopátrico da espécie (PEREIRA et al., 2009).

Com o auxílio de metodologias de marcação/recaptura, comportamentos filopátricos vêm sendo demonstrados em outras espécies de peixes, incluindo o bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (ROBICHAUD; ROSE, 2001, 2004; SVEDÄNG et al., 2007, 2010), o linguado *Pleuronectes platessa* (HUNTER et al., 2003) e a pescada *Cynoscion regalis* (THORROLD et al., 2001), mostrando que estas espécies foram capturadas próximas e/ou no próprio sítio de desova em sucessivas épocas reprodutivas, evidenciando assim a filopatria destas espécies como mecanismo de estruturação populacional. Por meio destes mesmos métodos, foi observado o limite máximo de 170 quilômetros de movimentação de exemplares de *Epinephelus itajara* no Caribe (Cuba). Tal padrão de movimentação foi atribuído principalmente a migração para os agrupamentos reprodutivos, sugerindo um comportamento igualmente filopátrico para a espécie (PINA-AMARGÓS; GONZÁLEZ-SANSÓN, 2009).

Por meio do uso dos dados moleculares de DNA, comportamentos filopátricos em peixes marinhos vêm sendo bem documentados, especialmente para espécies de ampla distribuição geográfica e/ou exploração pesqueira (JORGENSEN et al., 2010; PORTNOY et al., 2010).

Tendo em vista que *E. itajara* se caracteriza simultaneamente como uma espécie de ampla distribuição geográfica, com apelo de exploração pesqueira ainda que protegida por lei, criticamente ameaçada de extinção e, com evidências para um comportamento filopátrico ao longo da sua distribuição, testar para a ocorrência de filopatria na espécie no Atlântico Sul se torna necessário para a melhor organização do seu plano de conservação. Assim, a presente pesquisa objetivou avaliar evidências de estruturação genético-evolutiva (DNAs nuclear e mitocondrial) em ambientes da costa brasileira que possam ser traduzidas como consequências de comportamento filopátrico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ISSR

Amostras teciduais de *E. itajara* de um total de 95 exemplares foram obtidas de dez localidades: Guiana Francesa(GF), Praia de Ajuruteua – Pará(PA), Estuário do Rio Parnaíba – Piauí(PI), litoral do Ceará(CE), Estuário do Rio Potengi – Rio Grande do Norte(RN), Estuário do Rio Formoso – Pernambuco(PE), Caravelas – Bahia(BA), São Vicente – São Paulo(SP), litoral do Paraná(PR) e São Francisco do Sul – Santa Catarina(SC) e se encontram na Tabela 1 e Figura 1.

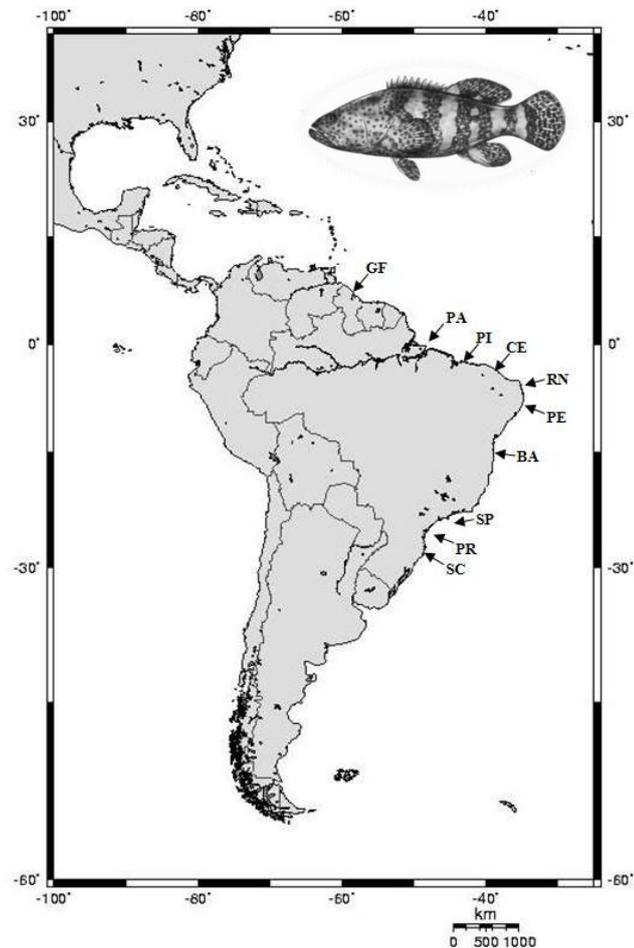


Figura 1 – Locais de amostragem das populações do Mero (*Epinephelus itajara*: em detalhe) ao longo da costa Atlântica da América do Sul

Tabela 1 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul para ISSR

LOCALIDADE	SIGLA	N
Guiana Francesa	GF	17
Pará	PA	17
Piauí	PI	12
Ceará	CE	01
Rio Grande do Norte	RN	08
Pernambuco	PE	11
Bahia	BA	15
São Paulo	SP	02
Paraná	PR	01
Santa Catarina	SC	11
		N= 93

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit de extração DNAEasy (QIAGEN) e o protocolo modificado de Fenol-Clorofórmio baseado no método escrito por Sambrook; Russel (2001).

As amplificações foram realizadas, seguindo os passos sugeridos por Almeida et al., (2003). A solução de PCR (20 µl volume total) consistia em 1 unidade de Taq Dna Polimerase (New England/Biolabs), 2µL de solução tampão (10x), 0,5µL de MgSO<sub>4</sub> (20mM), 0,5µL de primer (50µM), 1,5 µL de dNTP (1,5mM) e 20ng de DNA genômico. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler e após a reação, foi realizada eletroforese em gel de agarose, e estes foram fotodocumentados em transluminador.

A análise das imagens dos géis de agarose resultou em uma matriz binária (0/1), onde os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e à ausência (0) de bandas.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para observar a eventual estratificação da variância genética, além de possibilitar inferências a respeito da estruturação genética das mesmas (EXCOFFIER et al., 1992). Para esta análise as dez populações foram analisadas de tal forma à testar para a disjunção da variância genética entre a amostra SC (Santa Catarina) das demais. Para tal, foi utilizado o software ARLEQUIN .3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2010).

No tocante às análise de agrupamento, os dados foram analisados pelos métodos de distância [Neighbor-joining (NJ; SAITOU; NEI, 1987)] e máxima

parcimônia (MP; FITCH, 1971), considerando em ambas as análises as espécies *Epinephelus morio* e *Mycteroperca marginata* como grupo externo. Tais análises foram desenvolvidas por meio do programa PAUP v.4.0b10\* (SWOFFORD, 2000), pela sua interface gráfica PaupUp v.1.0.3.1 (CALENDINI; MARTIN, 2005). Todos os procedimentos supramencionados foram desenvolvidos por meio do uso dos softwares Paup\* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2000) e Nona v. 2.0 (GOLOBOFF, 2006). O uso deste último foi facilitado pela sua interface gráfica Winclada (NIXON, 2000).

Com os dados de distância genética par-a-par entre os indivíduos, fornecidos pelo NJ, foi construída uma matriz das médias da distância genética entre todos os indivíduos para as localidades estudadas. A partir desta, foi realizada uma regressão linear entre os dados obtidos de distância genética e distância geográfica entre todas as populações amostradas, objetivando testar para o isolamento por distância entre as amostras acessadas, perante a eventual correlação entre estas distâncias por meio do software Statistica v.6.0 (Statsoft Inc.). A distância, em Km, foi estimada em linha reta entre as localidades amostradas ao longo do costa pelo uso da plataforma Google Earth.

Os parâmetros de genética populacional do tipo fluxo gênico ( $N_m$ = Número de migrantes por geração) e variabilidade genética inter-específica ( $G_{ST}$ ) globais e par-a-par, foram obtidos por meio do uso do software Popgen 1.32 (YEH et al, 1999).

Foram realizadas ainda estimativas de teste de estruturação populacional por meio do método Bayesiano, afim de observar o possível número de K-populações genéticas (população homogênea ou heterogênea) por meio do software STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003; 2007; HUBISZ et al., 2009)

### 3.2 mtDNA

Um total de 192 exemplares foram coletados ao longo das regiões tropicais do Pacífico, Caribe e das províncias do Atlântico Sul e os locais de coleta estão resumidos na Figura 2 e Tabela 2.

Seqüências do gene citocromo b foram acessadas seguindo os procedimentos fornecidos por Craig et al.(2009). As seqüências foram editadas manualmente e alinhadas usando BioEdit v.5.0.9 (HALL, 1999) seguindo os

alinhamentos múltiplos do Clustal W. Para tal, a abertura e extensão de *gaps* foram designadas como 15 e 0,3, respectivamente (HALL, 2001). No alinhamento as extremidades das seqüências foram cortadas em suas regiões terminais e iniciais de modo a evitar a acumulação de diferenças entre os sítios analisáveis. O alinhamento foi exportado como um arquivo Nexus e o modelo evolutivo da variância dos sítios de citocromo b foi testado no programa ModelTest v3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998) e modelo designado foi HKY85.



Figura 2 – Mapa indicando os locais de amostragem na América Central e do Sul. Números de 1-10 indicam respectivamente: Panamá (Pan), Punta Gorda (PG, Belize), Florida (Flo, USA), Guiana Francesa (GF), Pará (Pa, Brasil), Piauí (Pi, Brasil), Ceará (Ce, Brasil), Rio Grande do Norte (RN; estuário do rio Potengi), Bahia (Ba, Brasil), e Santa Catarina (SC, Brasil).

Tabela 2 – Número de indivíduos de *Epinephelus itajara* obtidos de cada localidade, ao longo da costa Atlântica da América do Sul para mtDNA

<b>LOCALIDADE</b>	<b>SIGLA</b>	<b>N</b>
<b>Panamá</b>	Pan	17
<b>Punta Gorda</b>	PG	22
<b>Florida</b>	Flo	11
<b>Guiana Francesa</b>	GF	10
<b>Pará</b>	Pa	88
<b>Piauí</b>	Pi	12
<b>Ceará</b>	Ce	2
<b>Rio Grande do Norte</b>	RN	9
<b>Bahia</b>	Ba	18
<b>Santa Catarina</b>	SC	3
		N=192

Os dados foram analisados por neighbor-joining (NJ com HKY85; SAITOU; NEI, 1987) máxima parcimônia [MP (FITCH, 1977; pesos iguais; 2:1 e 3:1 para TV / TS)] e máxima verossimilhança (ML pelos parâmetros obtidos pelo modelo HKY85).

Os algoritmos NJ MP foram implementados usando Paup v.4.0 b10 (SWOFFORD, 2000) através de sua interface gráfica PaupUp (CALENDINI; MARTIN, 2005) com a espécie co-genérica *E. lanceolatus* (Genebank acesso DQ486927, DG486928, DQ372727) como grupo externo. A análise de NJ forneceu a distancia genética (distâncias HKY85) entre os terminais.

A análise de MP foi realizada através de busca heurística e o número de árvores analisadas (MaxTrees) foi 100.000 com 5.000 repetições aleatórias pela adição aleatória de terminais e pelo algoritmo de bissecção e reconexão de árvores (TBR) para a permutação dos ramos. A regra do consenso da maioria foi computada. Para as topologias resultantes de NJ e MP, foram computados os métodos de suporte de ramos bootstrap e jackknife a partir de 1000 pseudo-réplicas. A análise de máxima verossimilhança, bem como o bootstrap, foram desenvolvidas usando o RaxML (servidor disponível na <http://phylobench.vital-it.ch/bb-raxml>).

Parâmetros de genética populacional e dados da história demográfica foram estimados pelo Arlequin v.3.11. (EXCOFFIER et al., 2005.) e DnaSP v.5.10.00 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ISSRs

Os dados obtidos pelos primers *ISSRs* amplificaram um total de 94 loci que variaram de 250bp (pares de base) a 1700bp (Tabela 3), sendo 92 polimórficos e 2 monomórficos.

Tabela 3 – Primers utilizados nas reações de PCR e seus respectivos resultados. Ta = temperatura de anelamento específica de cada primer

Primer	Sequência (5' - 3')	Ta°C	Faixa de tamanho das bandas	Nº de loci
ISSR 1	(AG)8T	50,4	1000 - 250	8
ISSR 3	(GA)8T	50,4	1300 - 350	17
ISSR 6	(AG)8YC	52,8	1300 - 300	11
ISSR 7	(AG)8YA	54,0	1500 - 400	13
ISSR 8	(GA)8YT	52,8	1000 - 350	8
ISSR 10	(GA)8YG	54,0	750 - 250	11
ISSR 14	(GGAC)3C	51,0	1700 - 350	16
ISSR 15	(GGAC)3T	51,0	1600 - 400	10
				N= 94

A análise de regressão entre as médias de distância genética e a distância geográfica entre as localidades (Tabela 4 e Figura 3) indicou que não houve relação entre as variáveis, apresentando um valor de  $R^2 = 0,034$ .

Tabela 4 – Valores de distância geográfica (acima da diagonal em km) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul. Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto.

	PE	SP	SC	BA	PA	PI	GF	RN	CE	PR
PE	-	2188	2637	1080	1714	1118	2668	338	858	2452
SP	0,1177	-	449	1108	3902	3306	4856	2526	3046	264
SC	0,3297	0,3009	-	1557	4351	3755	5305	2975	3495	185
BA	0,1258	0,1622	0,2867	-	2794	2198	3748	1938	2458	1372
PA	0,1091	0,1328	0,3058	0,1306	-	596	954	1376	856	4166
PI	0,1672	0,1849	0,2957	0,1601	0,1429	-	1550	780	260	3570
GF	0,1146	0,1621	0,3021	0,1231	0,1040	0,1311	-	2330	1810	5120
RN	0,1591	0,2024	0,3001	0,1224	0,1469	0,1204	0,1322	-	520	2790
CE	0,1392	0,1484	0,2979	0,1419	0,1233	0,1280	0,1139	0,1185	-	3310
PR	0,1113	0,1355	0,3718	0,1789	0,1309	0,1774	0,1450	0,1879	0,1290	-

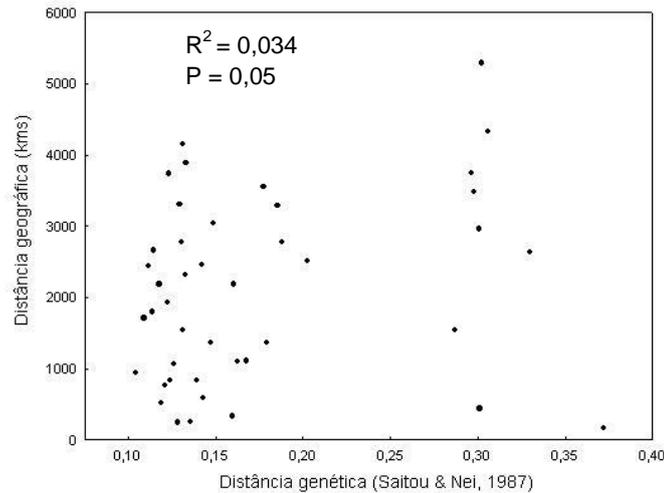


Figura 3 – Regressão linear entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *Epinephelus itajara* estudadas na costa Atlântica da América do Sul

A análise de neighbor-joining revelou a existência de dois agrupamentos genéticos mais característicos com baixo distanciamento genético entre as localidades, exceto para SC, que formou um dos agrupamentos em separado do restante das localidades (Figura 4). A topologia obtida ainda mostrou a ocorrência de algumas unidades genéticas individuais tais como as amostras oriundas do Piauí (PI) e Rio Grande do Norte (RN).

A análise de parcimônia gerou um total de 25000 árvores igualmente parcimoniosas ( $L = 643$ ,  $Ci = 24$ ,  $Ri = 71$ ) à partir dos 95 caracteres. A análise de consenso (Consenso estrito) gerou uma topologia (Figura 5) com  $L(\text{número de passos}) = 685$ , índice de consistência ( $Ci$ )=22 e índice de retenção ( $Ri$ )= 69. A topologia obtida (Figura 6) revelou dois grupos monofiléticos com alto suporte de ramos (Bootstrap/Jacknife) para *E. itajara*. Um ramo formado por indivíduos de Santa Catarina (SC) e o outro pelas outras populações amostradas, incluindo alguns indivíduos de SC.



Figura 4 – Topologia de Neighbor-Joining (NJ) obtida entre os exemplares de *Epinephelus itajara* oriundos das localidades amostradas. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

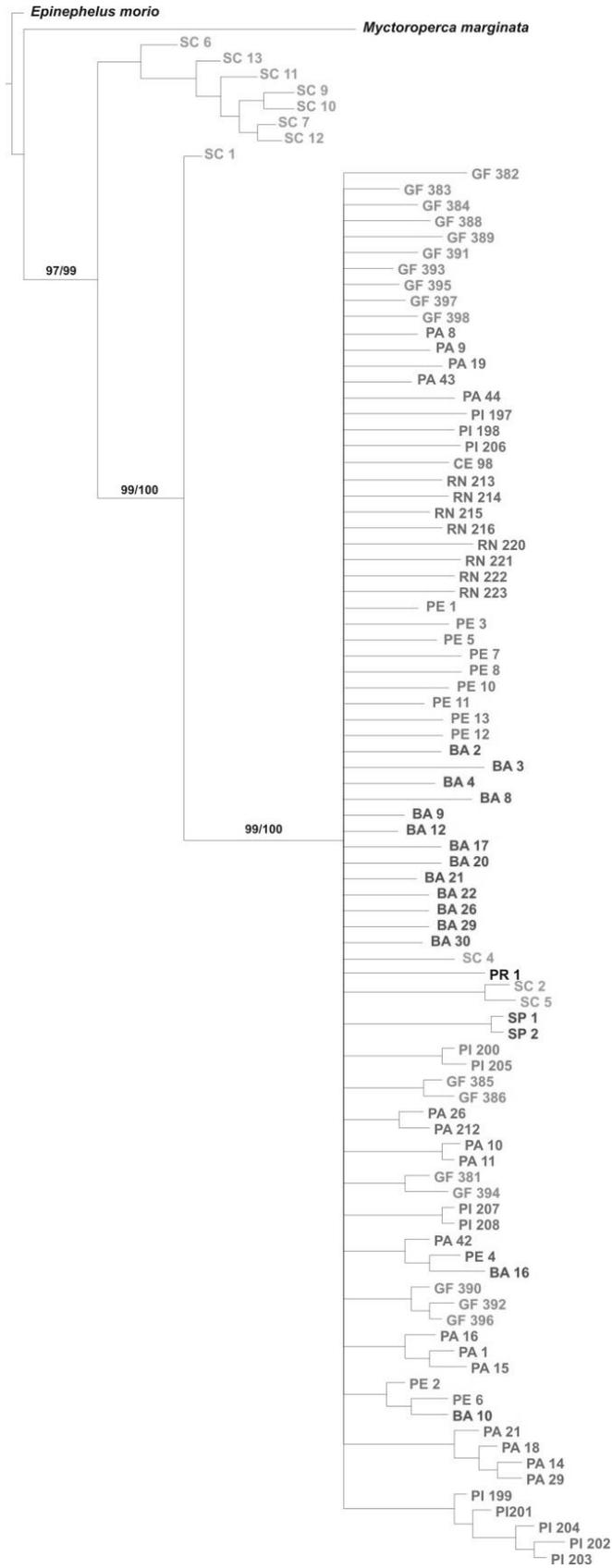


Figura 5 – Topologia de máxima parcimônia obtida entre os exemplares de *Epinephelus itajara* oriundos das localidades amostradas. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto.

Os resultados relativos ao teste de estruturação populacional pela análise Bayesiana revelou a existência de K= 2 populações genéticas, (Figura 6).

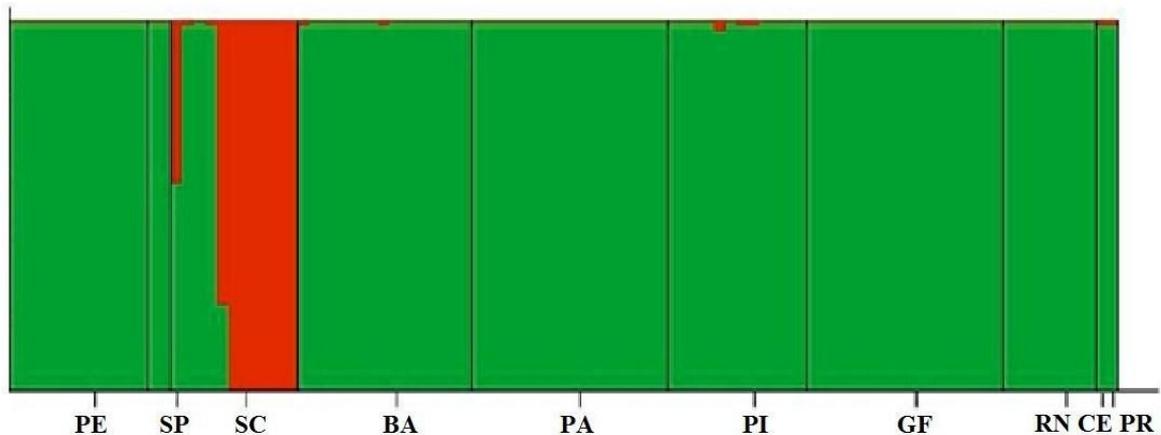


Figura 6 – Estruturação bayesiana mostrando a existência de duas populações (K=2) para *Epinephelus itajara* ao longo da costa Atlântica da América do Sul.

Nota: Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que o nível de variância genética entre os grupos foi de 43,65%, entre as populações dentro dos grupos de 18,18% e dentro dos grupos 38,17%. Tal análise evidenciou ainda os índices de fixação de  $F_{CT} = 0,436$ ,  $F_{SC} = 0,322$  e o  $F_{ST} = 0,618$  (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de variância molecular para as populações de *Epinephelus itajara* divididas em dois grupos. Grupo 1: GF, PA, PI, CE, RN, PE, BA, SP, PR, Grupo 2: SC.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre os grupos	1	219,397	8,75411 Va	43,65
Entre as populações dentro dos grupos	8	321,365	3,64606 Vb	18,18
Dentro das populações	86	658,447	7,65636 Vc	38,17
<b>TOTAL</b>	<b>95</b>	<b>1199,208</b>	<b>20,05653</b>	
Índices de Fixação	$F_{SC}$	0,32259		
	$F_{ST}$	0,61826		
	$F_{CT}$	0,43647		

Nota: gl= graus de liberdade. Para siglas consulte a Tabela 2 e o texto.

Os outros parâmetros de genética populacional apresentaram valores globais de 0,6628 e 0,2544, respectivamente para  $G_{ST}$  e  $N_m$ . Já, quando analisados de forma pareada entre as diferentes amostragens, foi observado que nenhuma das comparações apresentaram diferenciação genética insignificante ( $G_{ST} \leq 0.05$ ), 2,3% das comparações com pouca diferenciação genética ( $0.15 > G_{ST} > 0.05$ ), 11,2% das comparações com diferenciação genética moderadamente grande ( $0.25 > G_{ST} > 0.15$ ) e 86,5% com forte diferenciação genética ( $G_{ST} \geq 0.25$ ) (SAITOU; NEI, 1987 e MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Em termos mais detalhados, foram observadas variações entre 0 migrantes (SP em relação a CE e RN e entre CE e PR) e 2,933 migrantes entre PA e GF, no que se refere a fluxo gênico histórico ( $N_m$ ). Já, para os índices pareados de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) foram observadas variações desde 0,146 entre os exemplares PA e aqueles GF, até 1,000 entre a amostra SP e as amostras CE e RN e entre a amostragem CE e PR. Todos os dados encontram-se sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de  $G_{ST}$  (acima da diagonal) e  $N_m$  (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *E. itajara*

	PE	SP	SC	BA	PA	PI	GF	RN	CE	PR
PE	-	0,556	0,512	0,240	0,229	0,461	0,238	0,431	0,593	0,577
SP	0,399	-	0,645	0,607	0,581	0,748	0,635	0,778	1,000	1,000
SC	0,476	0,275	-	0,406	0,467	0,510	0,459	0,509	0,624	0,696
BA	1,582	0,323	0,733	-	0,230	0,389	0,184	0,249	0,537	0,654
PA	1,683	0,360	0,571	1,672	-	0,363	0,146	0,371	0,514	0,613
PI	0,584	0,169	0,480	0,785	0,876	-	0,316	0,395	0,624	0,751
GF	1,599	0,287	0,590	2,218	2,933	1,084	-	0,280	0,455	0,617
RN	0,660	0,143	0,481	1,505	0,846	0,765	1,286	-	0,639	0,770
CE	0,344	0,000	0,301	0,430	0,472	0,301	0,599	0,283	-	1,000
PR	0,366	0,000	0,219	0,264	0,316	0,166	0,310	0,149	0,000	-

Nota: Os valores em destaque indicam índices obtidos entre a amostragem SC e as demais. Para siglas consulte a Tabela 1 e o texto

### 3.2 mtDNA

A análise NJ revelou quatro unidades genéticas bem suportadas para *E. itajara* (Figura 7). Entre estas unidades destacou-se unidade genética que inclui todos os espécimes do Rio Grande do Norte. Assim, a topologia de NJ revelou

padrões de estruturação genética local ocorrendo no estuário do rio Potengi (localidade específica do RN) (Figura 7).

A topologia do consenso da maioria (Figura 8) surgiu de 131 árvores igualmente parcimoniosas ( $L = 135$ ;  $Ci = 74$ ;  $Ri = 94$ ). A análise também permitiu a identificação de quatro grupos bem separados evolutivamente sendo um deles em destaque na presente abordagem, o qual compreende todos os espécimes do Rio Grande do Norte (RN).

A topologia de ML foi produzida com o modelo molecular de evolução HKY85 considerando o "critério corrigido de informação de Akaike" ( $LNL = 1320,9417$ ;  $K = 343$ ;  $AICc = 1963,8140$ ; relação  $Ti/tv = 5,6354$ ). As relações evolutivas obtidas para a espécie foram praticamente idênticas às observadas pelos outros métodos de sistemática molecular e, permitiu identificar os mesmos quatro clados distintos, sendo igualmente em destaque aquele que reúne os exemplares RN (Figura 9).

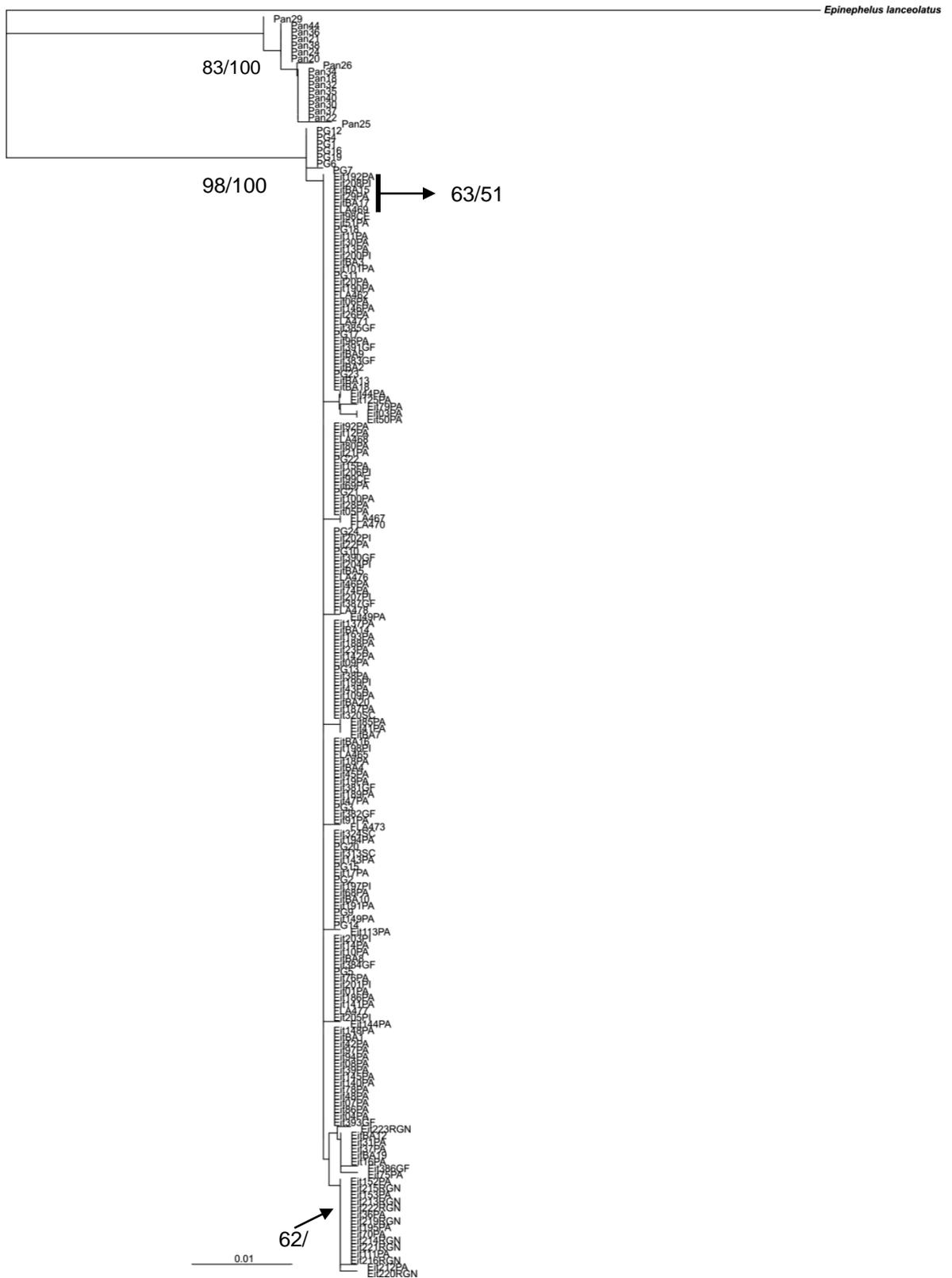


Figura 7 – Topologia de NJ obtida à partir da análise das seqüências de citocromo b .  
Nota: Os valores indicados representam índices de bootstrap obtidos. Para as siglas, consulte a Figura 2 e o texto.



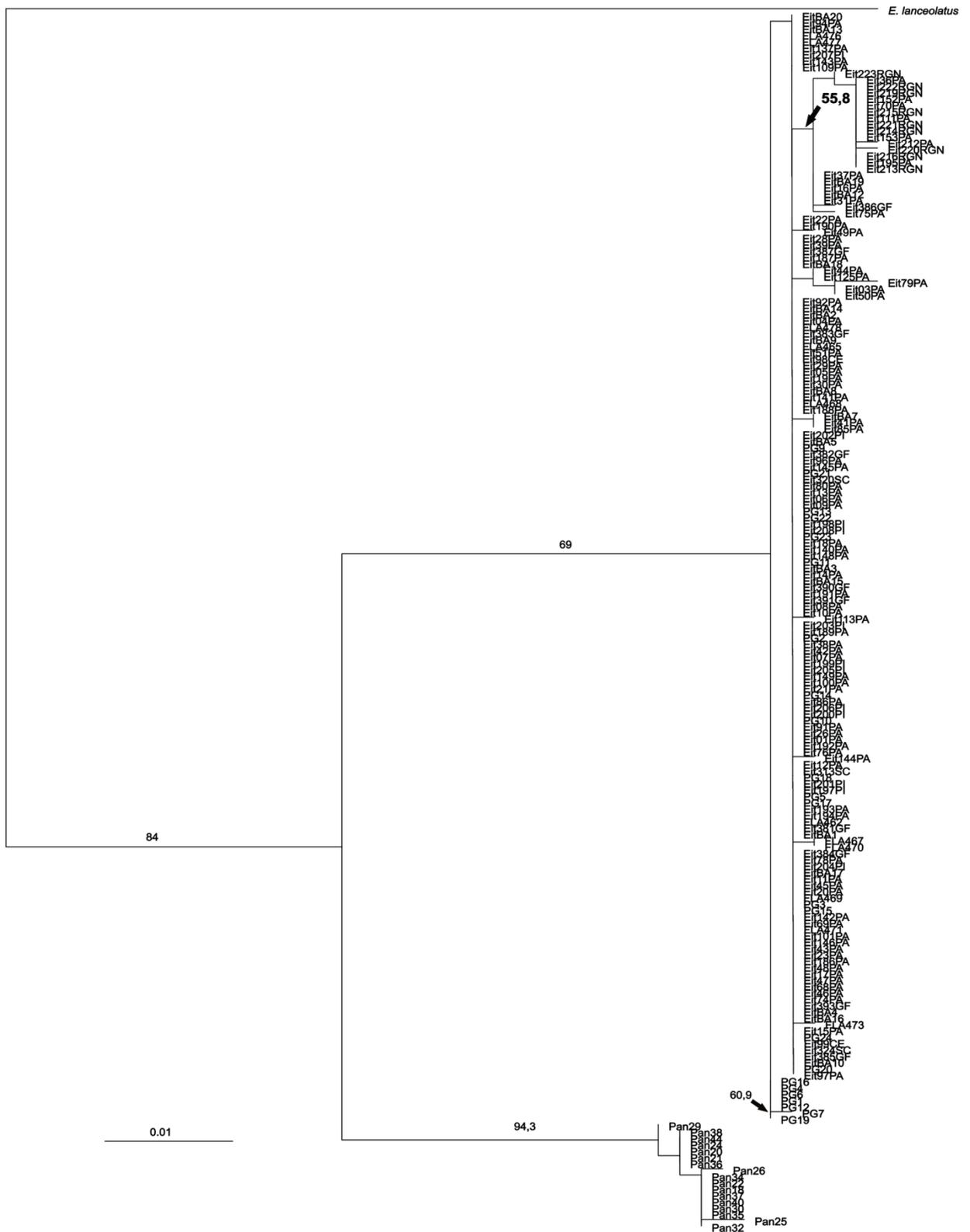


Figura 9 – Topologia de Maxima Verossimilhança (ML) obtida à partir da análise das seqüências de citocromo b .  
 Nota: Os valores indicados representam índices de bootstrap obtidos. Para as siglas, consulte a Figura 2 e o texto.

O  $F_{ST}$  par-à-par revelou que 35,55% das comparações mostram diferenciação genética insignificante ( $F_{ST} \leq 0,05$ ), 13,33%, com pequena diferenciação genética ( $0,15 > F_{ST} > 0,05$ ), 11,12% com diferenciação genética moderadamente grande ( $0,25 > F_{ST} > 0,15$ ), e 40% deles com forte diferenciação genética ( $F_{ST} \geq 0,25$ ) (Para mais informações, por favor leia WRIGHT, 1978; Tabela 7).

Tabela 7 – Comparações  $F_{ST}$  par-à-par entre as amostras de *Epinephelus itajara*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-									
2	0.979	-								
3	0.977	0.161	-							
4	0.971	0.126	0.026	-						
5	0.981	0.155	0.049	0.015	-					
6	0.983	0.169	0.076	0.019	-0.030	-				
7	0.973	-0.093	-0.259	-0.323	-0.331	0.000	-			
8	0.965	0.566	0.490	0.418	0.554	0.578	0.280	-		
9	0.981	0.167	0.067	0.000	-0.011	0.009	-0.293	0.565	-	
10	0.972	0.160	0.067	-0.047	0.104	0.466	-0.200	0.357	0.138	-

Nota: (1) Pan, (2) PG, (3) Flo, (4) FG (5) Pa, (6) Pi, (7) Ce, (8) RN; (9) Ba, and (10) SC. Os valores em destaque revelam os índices de fixação observados entre RN e as demais amostras. Para as abreviações consulte a Figura 2.

Já, as comparações de  $G_{ST}$  par-à-par (diferenciação genética) entre os mesmos espécimes revelaram que 31,11% das comparações mostram diferenciação genética insignificante ( $G_{ST} \leq 0,05$ ), 24,44% com a diferenciação genética baixa ( $0,15 > G_{ST} > 0,05$ ), 6,66% com diferenciação genética moderadamente grande ( $0,25 > G_{ST} > 0,15$ ) e 37,79% com diferenciação genética muito forte ( $G_{ST} \geq 0,25$ ) (Para mais informações, por favor leia SAITOU; NEI, 1987 e MEIRMANS; HEDRICK, 2011; Tabela 8]. Já a análise da diversidade haplotípica revelou que os exemplares da localidade RN são oriundos de uma única condição haplotípica (H23).

Tabela 8 – Comparações  $G_{ST}$  par-à-par entre as amostras de *Epinephelus itajara*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-									
2	0.271	-								
3	0.251	0.026	-							
4	0.341	0.047	0.013	-						
5	0.213	0.025	0.015	0.020	-					
6	0.443	0.097	0.074	0.000	0.030	-				
7	0.224	0.107	0.086	0.062	0.107	1.000	-			
8	0.258	0.336	0.380	0.532	0.189	0.684	0.422	-		
9	0.339	0.040	0.007	-0.002	0.006	0.034	0.088	0.453	-	
10	0.252	0.083	0.063	0.030	0.074	1.000	1.000	0.494	0.058	-

Nota: (1) Pan, (2) PG, (3) Flo, (4) FG (5) Pa, (6) Pi, (7) Ce, (8) RN; (9) Ba, and (10) SC. Os valores em destaque revelam os índices de diferenciação genético-evolutiva observados entre RN e as demais amostras. Para as abreviações consulte a Figura 2.

## 4 DISCUSSÃO

Baseado nos resultados apresentados é possível observar que *Epinephelus itajara* apresenta duas populações estruturadas na costa brasileira, revelando que as populações marinhas com dispersão planctônica podem exibir estruturação genética mesmo em um ambiente aparentemente homogêneo (HAUSER; CARVALHO, 2008; NIELSEN et al., 2005). Os dados ainda evidenciam que diferentes marcadores podem revelar cenários eco-demográficos distintos e reforçam as evidências já demonstradas para comportamentos filopátricos mediados por cada um dos sexos (GONZALEZ; ZARDOYA, 2007; JORGENSEN et al., 2010; LEMAIRE et al., 2005; MARTINS et al., 2007; PORTNOY et al., 2010). Tal conclusão é sustentada pelo fato da atual abordagem ter sido baseada no DNA nuclear (ISSRs), que indica estruturação para a população de Santa Catarina (SC), enquanto que aquela obtida pelo mtDNA revela estruturação para o Rio Grande do Norte (RN).

### *Estruturação na Baía de Babitonga (SC)*

Com base nos resultados apresentados é possível observar alta estruturação genético-populacional dos indivíduos de Santa Catarina (SC) em relação às outras populações de *E. itajara* baseadas nos marcadores ISSR. Os exemplares provenientes de SC foram amostrados em São Francisco do Sul (SC), no interior da baía de Babitonga. Estudos realizados nesta região, baseados no conhecimento local dos pescadores, indicam a ocorrência da espécie tanto dentro, quanto fora da baía. Em termos específicos, principalmente juvenis e também adultos vêm sendo principalmente observados nas épocas de desova, formando a maior agregação reprodutiva na costa do Brasil, como documentado na FIGURA 10 e 11 (GERHARDINGER et al., 2009). Cabe destacar que todos os exemplares aqui amostrados eram adultos e foram capturados nos arredores da baía da Babitonga.

Outro fator importante seria o sistema hidrodinâmico da baía da Babitonga evidenciado por OLIVEIRA (2000) que poderia favorecer a retenção autóctone de larvas de *E. itajara* na região. Tal hipótese é fortemente sustentada pelas evidências genéticas, filogenéticas e de genética populacional aqui obtidas, uma vez que tal

modelo de retenção minimizaria o fluxo gênico da espécie ao longo da sua distribuição geográfica, favorecendo a estruturação. Larvas de serranídeos em geral são planctônicas e, portanto, sujeitas ao sistema de correntes marinhas para o deslocamento e assentamento (SADOVY; EKLUND, 1999). Porém, os dados aqui obtidos refutam tal hipótese e argumentam em favor de um modelo não aleatório de deslocamento e assentamento larval de *E. itajara* na baía da Babitonga.

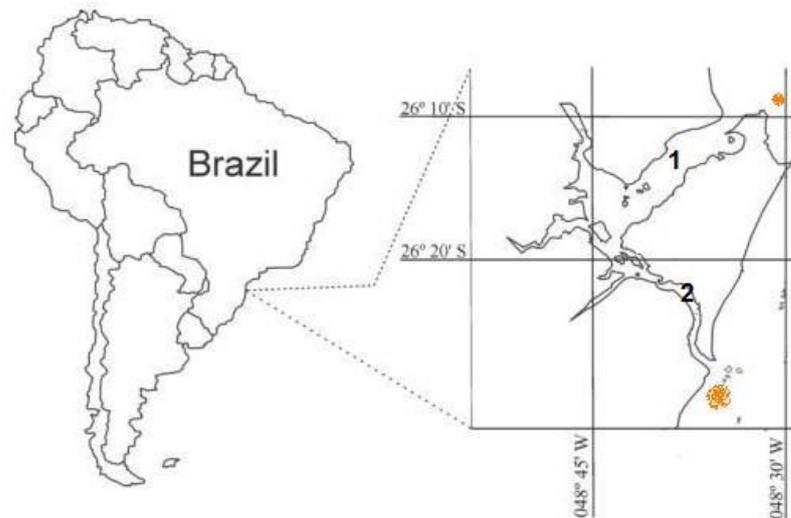


Figura 10 – Ilha de São Francisco do Sul (SC).

Nota: (1) Baía de Babitonga, (2) Canal do Linguado. Detalhes em laranja representam as duas principais agregações de *Epinephelus itajara* da região.

Fonte: Modificado de Gerhardinger et al. (2009).

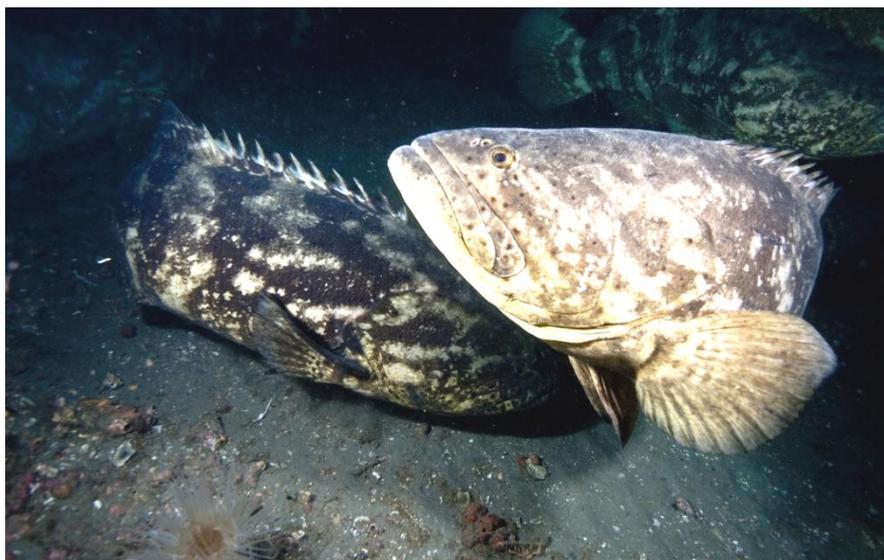


Figura 11 – Agregação de *Epinephelus itajara* em São Francisco do Sul (SC) documentada em Dezembro de 2010 e observada pelo terceiro ano consecutivo na mesma região.

Fonte: MSc. Athila Bertoncini

As evidências aqui obtidas indicam forte estruturação genético-evolutiva desta população local. Portanto, a união das evidências das agregações reprodutivas com aquelas aqui obtidas sugerem a hipótese de ocorrência de um comportamento filopátrico de *E. itajara* nessa região, mediado por machos e fêmeas, devido à natureza do material genético acessado (DNA nuclear). Ainda é possível inferir que, aliado ao provável comportamento filopátrico, a espécie também pode estar sofrendo influência de fatores ambientais na região que comprometem a conectividade da população de SC com as demais, resultando na alta diversificação genética, filogenética e na estruturação populacional encontrada para a espécie na região.

#### *Estruturação no estuário do rio Potengi (RN)*

Os dados obtidos para mtDNA identificaram que a população do RN forma um agrupamento separado em relação as demais localidades estudadas. Em populações abertas, quando existe evidência de estruturação, esta ocorre principalmente por barreiras ou fatores ambientais que impedem a dispersão e conseqüentemente o fluxo gênico (BECKER et al., 2007; MORA; SALE, 2002; PATTERSON; SWEARER, 2007). Todavia, essa evidência não foi observada na amostragem oriunda do rio Potengi (RN).

Nessa região parece não haver registros que impediria a ausência ou a limitada conectividade entre RN e as demais populações. Entretanto, sabe-se que outros fatores da história de vida das espécies podem contribuir para estruturação populacional, um destes seria a fidelidade à região de natalidade, denominado de *homing* ou filopatria (STEPIEN; FABER, 1998). Cabe mencionar que tais fenômenos já foram previamente observados em outras espécies de peixes com dispersão planctônica (HUNTER et al., 2003; ROBICHAUD; ROSE, 2004; SVEDÄNG, 2010; THORROLD et al., 2001). Estudos com *E. itajara* no Caribe também evidenciaram um possível comportamento de filopatria para a espécie na região (PINA-AMARGÓS; GONZÁLEZ-SANSÓN, 2009). Assim, as evidências apresentadas sugerem que a estruturação observada pode ser um indicativo de uma segunda

população de *E. itajara* com comportamento filopátrico da espécie na costa brasileira.

Os dados apresentados pelos ISSRs, quando comparados aos do mtDNA, só agrupam os indivíduos do RN na topologia do NJ (Figura 4), entretanto não apresenta um suporte estatístico robusto, sendo considerado um único agrupamento juntamente com as demais populações amostradas para os ISSRs. Devido a herança materna do mtDNA, sugere-se que o fenômeno filopátrico da espécie do estuário do rio Potengi seja mediado apenas pelas fêmeas de *E. itajara*. A filopatria de apenas um dos sexos é comum, sendo principalmente observada nas fêmeas, e é denominada de *estruturação populacional complexa* (BOWEN et al., 2005). Dessa maneira, quando se utilizam marcadores uniparentais, como o mtDNA, a estruturação é comprovada, mas quando o marcador é biparental, a estrutura populacional não aparece (GOUDET et al., 2002), assim como o padrão observado para *E. itajara* baseado no mtDNA. Dessa forma, com base nas evidências apresentadas, é possível afirmar que as fêmeas no RN apresentam filopatria, enquanto que a dispersão dos machos pode facilmente explicar a baixa estruturação observada para marcadores do DNA nuclear na região.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. S. et al. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema River (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, Brazil, v.26, n.3, p.301-305. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v26n3/a14v26n3.pdf>>. Acesso em: 25 jan 2011.

BECKER, B. J. et al. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.104, n.9, p.3267–3272. 2007.

BOWEN, B. W. et al. Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, v.14, p.2389–2402. 2005. Disponível em: <<http://www2.hawaii.edu/~toonien/files/Bowen-et-al-05.pdf>>. Acesso em: 23 sept 2010.

CALENDINI, F.; MARTIN, J. F. PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup\* Dos software. 2005.

COWEN, R. K. et al. Scaling of Connectivity in Marine Populations. *Science*, v.311, p.522–527. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/311/5760/522.full.pdf>>. Acesso em: 15 mar 2011

COWEN, R. K. et al. Population connectivity in marine systems. *Oceanography*, v.20, n.3, p.14–21. 2007. Disponível em: <[https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3\\_cowen\\_et\\_al.pdf?sequence=1](https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3_cowen_et_al.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 15 mar 2011.

COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, v.1, p.443–466. 2009. Disponível em: <[http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST\\_010809/Cowen\\_etal\\_2009.pdf](http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST_010809/Cowen_etal_2009.pdf)>. Acesso em: 15 mar 2011

CRAIG, M. T. et al. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*, v.7, p.167-174. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2008/theme/Goliath/goliathpp1.pdf>>. Acesso em: 5 may 2011.

EXCOFFIER, L. et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491. 1992. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/131/2/479.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 may 2010.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER; S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, v.1, p.47-50. 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x/pdf>>. Acesso em: 13 may 2010.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked Loci and correlated allele frequencies. *Genetics*; v. 164, p.1567–1587. 2003. Disponível em: < <http://www.genetics.org/content/164/4/1567.full.pdf+html>>. Acesso em: 9 jan 2011.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, v.4, n.7, p.574–578. 2007. Disponível em: < <http://pritch.bsd.uchicago.edu/publications/FalushEtAl07.pdf>>. Acesso em: 17 may 2010.

FITCH, W. M. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, v.20, p.406-416. 1971. Disponível em: < <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1987/A1987H855200001.pdf>>. Acesso em: 23 nov 2010.

GALARZA, J. A. et al. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.106, n.5, p.1473-1478. 2009. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/106/5/1473.full.pdf+html>>. Acesso em: 3 june 2010.

GERHARDINGER, L. C. et al. Fishers' resource mapping and goliath grouper *Epinephelus itajara* (Serranidae) conservation in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.7, n.1, p.93-102. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-62252009000100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-62252009000100012&script=sci_arttext)>. Acesso em: 14 feb 2011.

GOLOBOFF, P. A. Nona v. 2.0. 2006. Disponível em: <<http://www.cladistics.com/nona.htm>>. Acesso em: 23 jan 2011.

GOUDET, J. et al. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology*, v.11, p.1103–1114. 2002. Disponível em: <[http://www2.unil.ch/popgen/research/reprints/goudetetal\\_mec\\_2002.pdf](http://www2.unil.ch/popgen/research/reprints/goudetetal_mec_2002.pdf)>. Acesso em: 18 mar 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98. 1999.

HALL, B. G. Phylogenetics trees made easy. A how to manual for molecular biologists. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Masssachusetts, 2001. 179p.

HAUSER, L.; CARVALHO, G. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, v.9, p.333-362. 2008. Disponível em: <[http://www.fish.washington.edu/research/alaska/publications/ASP\\_Papers/Hauser%20%26%20Carvalho%2008%20Paradigm%20shifts.pdf](http://www.fish.washington.edu/research/alaska/publications/ASP_Papers/Hauser%20%26%20Carvalho%2008%20Paradigm%20shifts.pdf)>. Acesso em: 12 oct 2010.

HUBISZ; M. J. et al. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, v.9, p.1322-1332. 2009. Disponível em: <<http://stephenslab.uchicago.edu/MSpapers/Hubisz2009.pdf>>. Acesso em: 3 feb 2011.

HUNTER, E. et al. Migration route and spawning area fidelity by North Sea plaice. *Proceedins of the Royal Society Lond B*, v.270, p.2097–2103. 2003. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/270/1529/2097.full.pdf>>. Acesso em: 13 june 2010.

JORGENSEN, S. J. et al. Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedins of the Royal Society B*, v.277, p.679–688. 2010.

KING, T. L. et al. Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Molecular Ecology*, v.10, n.4, p.807–821. 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294X.2001.01231.x/pdf>>. Acesso em: 12 feb 2011.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v.25, n.11, p.1451-1452. 2009.

MARTINS, F. M. et al. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v.45, n.4, p.372–378. 2007.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. (2011). Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5–18. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x/pdf>>. Acesso em 15 jun 2011.

MORA, C.; SALE, P. F. Are populations of coral reef fish open or closed?. *Trends in Ecology and Evolution*, v.17, n. 9, p.422-428. 2002. Disponível em: <<http://faculty.bennington.edu/~sherman/the%20ocean%20project/reef%20fish%20pops%20open%20or%20closed.pdf>>. Acesso em: 2 feb 2011..

NIELSEN, E. E. et al. Retention of juveniles within a hybrid zone between North Sea and Baltic Sea Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.62, p.2219–2225. 2005. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/f05-139>>. Acesso em: 8 mar 2011.

NIXON, K. C. Winclada v.0.9.99m24. 2000. Disponível em: <<http://www.cladistics.com/winclada.htm>>. Acesso em: 18 nov 2010.

OLIVEIRA, M. S. C. Heranças da Babitonga: Aspectos paleoambientais e pré-históricos das planícies costeiras de Joinville. In: Seminário Gestão dos recursos naturais em ecossistemas costeiros, com ênfase à Baía da Babitonga, SC. Joinville, 2000. *Anais...* Joinville: FUNDEMA e UNIVILLE.

PALUMBI, S. R. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*, v.7, n.4, p.114-118. 1992.

PATTERSON, H. M.; SWEARER, S. E. Long-distance dispersal and local retention of larvae as mechanisms of recruitment in an island population of a coral reef fish. *Austral Ecology*, v.32, p.122-130. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-9993.2006.01669.x/pdf>>. Acesso em: 20 feb 2011.

PEREIRA, L. H. G. et al. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*, v.18, n.2, p.215–225. 2009.

PINA-AMARGÓS, F.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G. Movement patterns of goliath grouper *Epinephelus itajara* around southeast Cuba: implications for conservation. *Endangered Species Research*, v.7, p.243–247. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2009/7/n007p243.pdf>>. Acesso em: 13 may 2011.

PORTNOY, D. S. et al. World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular Ecology*, v.19, n.10, p.1994–2010. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2010.04626.x/pdf>>. Acesso em: 15 mar 2011.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, v.14, n.9, p.817-818. 1998.

PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945–959. 2000. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/155/2/945.full.pdf>>. Acesso em 12 jan 2011.

ROBICHAUD, D.; ROSE, G. A. Multiyear homing of Atlantic cod to a spawning ground. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.58, p.2325–2329. 2001. Disponível em: <<http://myweb.dal.ca/ibradbur/f01-190.pdf>>. Acesso em: 18 jan 2011.

ROBICHAUD, D.; ROSE, G. A. Migratory behaviour and range in Atlantic cod: inference from a century of tagging. *Fish and Fisheries*, v.5, n.3, p.185–214. 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-2679.2004.00141.x/pdf>>. Acesso em: 18 jan 2011.

SADOVY, Y.; EKLUND, A. Synopsis of Biological Data on the Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, and the Jewfish, *E. itajara*. *NOAA Tech Rep*, 1999. 65p.

SALE, P. F. et al. Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. *Trends in Ecology and Evolution*, v.20, p.74–80. 2005. Disponível em: <[http://tarantula.bren.ucsb.edu/academics/courses/260/Readings/Sale\\_et\\_al\\_2005.pdf](http://tarantula.bren.ucsb.edu/academics/courses/260/Readings/Sale_et_al_2005.pdf)>. Acesso em: 15 nov 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, n.4 p.406-425. 1987. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.full.pdf>>. Acesso em: 13 may 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 2001.

STEPIEN, C. A.; FABER, J. E. Population genetic structure, phylogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, v.7, p.1757-1769. 1998. Disponível em: <<http://www.utoledo.edu/nsm/lec/pdfs/Stepien&Faber98walleye.pdf>>. Acesso em: 30 nov 2010.

SVEDÄNG, H. et al. Migratory behaviour of Atlantic cod *Gadus morhua*: natal homing is the prime stock-separating mechanism. *Marine Ecology Progress Series*, v.345, p.1–12. 2007. Disponível em: <[http://www.int-res.com/articles/suppl/m345p001\\_app.pdf](http://www.int-res.com/articles/suppl/m345p001_app.pdf)>. Acesso em: 3 dec 2010.

SVEDÄNG, H. et al. Migratory behaviour and otolith chemistry suggest fine-scale sub-population structure within a genetically homogenous Atlantic Cod population. *Environmental Biology of Fishes*, v.89, n.3-4, p.383-397. 2010.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Vers. 4. Sinauer, Sunderland, MA., 2000.

TAK-CHUEN, C.; FERREIRA, B. P. *Epinephelus itajara* - IUCN Red List of Threatened Species, 2006. In: *IUCN Red List of Threatened Species*. 2010. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 15 aug. 2011.

THORROLD, S. R. Ocean Ecology: Don't Fence Me in. *Current Biology*, v.16, n. 16, p.638-640. 2006. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272099&\\_user=10&\\_pii=S0960982206019014&\\_check=y&\\_coverDate=2006-08-22&view=c&\\_gw=y&wchp=dGLzVlt-zSkzk&md5=1c6fa6ac4d0a34e43a20857674c8bae1/1-s2.0-S0960982206019014-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272099&_user=10&_pii=S0960982206019014&_check=y&_coverDate=2006-08-22&view=c&_gw=y&wchp=dGLzVlt-zSkzk&md5=1c6fa6ac4d0a34e43a20857674c8bae1/1-s2.0-S0960982206019014-main.pdf)>. Acesso em: 2 mar 2010.

TREML, E. A. et al. Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecology*, v.23, p. 19-36. 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/vx6q801240166330/>>. Acesso em: 5 feb 2010.

WATSON, J. R. et al. Realized and potential larval connectivity in the Southern California Bight. *Marine Ecology-Progress Series*, v.401, p.31-48. 2010.

WEERSING, K.; TOONEN, R. J. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, v.393, p.1-12. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/feature/m393p001.pdf>>. Acesso em: 12 jan 2011.

WEIMERSKIRCH, H.; WILSON, R. P. Oceanic respite for wandering albatrosses. *Nature*, v.406, p.955–956. 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v406/n6799/pdf/406955a0.pdf>>. Acesso em 20 oct 2010.

WRIGHT, S., *Evolution and Genetics of Populations*, v. 2: The Theory of Gene Frequencies. London: University of Chicago Press, 1978.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que os marcadores moleculares, como já evidenciados, apresentam-se como ferramentas eficientes nos estudos de genética populacional em peixes, assim como no entendimento da conectividade genética das populações.

Perante o genoma nuclear, *Epinephelus itajara* apresentou um patamar de variabilidade genética global mediano (~50%), onde foi possível inferir que a espécie está sob risco adaptativo. Além disso, a população de Santa Catarina (SC) apresenta uma alta diversidade genética, enquanto que nas outras localidades a diversidade é de baixa à mediana.

Foi possível observar, a partir dos ISSRs, duas populações estruturadas e isoladas (SC e as demais localidades), sendo consideradas ESUs (Unidades Significativamente Evolutivas) independentes. Além disso, a estruturação observada em SC indica um provável comportamento filopátrico da espécie nesta região.

Os dados de mtDNA, entretanto, mostram que as populações estruturadas seriam: (1) Rio Grande do Norte (RN) e (2) as demais localidades. Neste caso, a filopatria seria realizada somente pelas fêmeas, devido a natureza do marcador, cuja herança é materna.

Assim, em termos da diversidade genética e de padrões históricos (evolutivos) da conectividade genética, as evidências encontradas neste estudo indicam que *Epinephelus itajara* na costa atlântica da América do Sul apresenta estruturação populacional. Tais evidências refutam a existência de uma única população panmítica ao longo de sua distribuição no Atlântico ( $H_0$ ), uma vez que acreditava-se que larvas planctônicas (como previamente sugerido na literatura) tenderiam à homogeneizar a diversidade genética e a história evolutiva de *E. itajara*. Além disso, as estruturações observadas apontam evidências para um comportamento filopátrico da espécie no estuário do rio Potengi (RN) e na baía da Babitonga (SC). Este comportamento ainda é mediado de forma variável nas populações estruturadas: fêmeas no rio Potengi e ambos os sexos na baía da Babitonga. No tocante ainda a esta notável evidência, a mediação da filopatria observada indica que estudos mais intensos devem ser desenvolvidos em ambas as áreas, afim de evidenciar se: (a) há a ocorrência nos arredores do estuário do rio Potengi de uma agregação reprodutiva similar àquela observada na baía da Babitonga (SC) e, (b) se existe alguma

dinâmica particular de correntes costeiras na baía da Babitonga (SC) capaz de reter larvas autóctones naquela região.

Considerando tais evidências é possível orientar planos de manejo e conservação distintos para *E. itajara* nas diferentes populações, afim de manter a integridade genética e evolutiva das mesmas nas áreas estudadas. Além disso e, no tocante a uma eventual iniciativa de restauração genética (aumento do potencial adaptativo), as evidências dos relacionamentos genéticos, da história evolutiva das populações, bem como dos potenciais comportamentos filopátricos observados devem ser fortemente respeitados, afim de permitir uma melhor perspectiva de sucesso adaptativo da espécie ao longo do tempo futuro.

## REFERÊNCIAS

APOSTOLIDIS, A. P. et al. Genetic structure of three marine fishes from the Gulf of Pagasitikos (Greece) based on allozymes, RAPD, and mtDNA RFLP markers. *Biologia*, v.64, n.5, p.1005-1010. 2009.

ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v.94, p.184-193. 2007. Disponível em: <<http://www.sekj.org/PDF/anb45-free/anb45-455.pdf>>. Acesso em: 5 oct 2010.

AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 1994.

AVISE, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, 2000.

BAY, L. K. et al. The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, v.149, n.5, p.1247-1256. 2006.

BERNARDI, G. et al. Gene flow at three spatial scales in a coral reef fish, the three-spot dascyllus, *Dascyllus trimaculatus*. *Marine Biology*, v.138, p.457–465. 2001. Disponível em: <<http://nature.berkeley.edu/gump/Research/gump-70a.pdf>>. Acesso em: 23 jan 2011.

BOWEN, B. W. et al. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution*, v.55, n.5, p.1029–1039. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430639>>. Acesso em: 4 feb 2010.

BOWEN, B. W. et al. Shallow mtDNA coalescence in Atlantic pygmy angelfish (genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean. *Journal of Heredity*, v.97, p.1-12. 2006. Disponível em: <<http://jhered.oxfordjournals.org/content/97/1/1.full.pdf>>. Acesso em: 14 sept 2010.

BROWN, W. M. The mitochondrial genome of animals. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. edited by R. J. MACINTYRE, Plenum Press. New York: 1985. 95-130.

BUGARSKI-STANOJEVIC, V. et al. Comparative study of the phylogenetic structure in six *Apodemus* species (Mammalia, Rodentia) inferred from ISSR-PCR data. *Systematics and Biodiversity*, v.9, n.1, p.95-106. 2011.

CASU, M. et al. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.368, n.2, p.147-152. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098108004656>>. Acesso em: 4 apr 2011.

CHATTERJEE, S. N. et al. ISSR profiling of genetic variability in the ecotypes of *Antheraea mylitta* Drury, the Tropical Tasar Silkworm. *Russian Journal of Genetics*, v.40, n.2, p.210-217. 2004.

CONOVER, D. O. et al. Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, v.69, p.21–47. 2006. Disponível em: <<http://floridarivers.ifas.ufl.edu/Carl%20Class/Carl%20Class%20II/Conover%20adaptive%20divergence.pdf>>. Acesso em: 21 jan 2011.

COWEN, R. K. et al. Scaling of Connectivity in Marine Populations. *Science*, v.311, p.522–527. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/311/5760/522.full.pdf>>. Acesso em: 15 mar 2011

COWEN, R. K. et al. Population connectivity in marine systems. *Oceanography*, v.20, n.3, p.14–21. 2007. Disponível em: <[https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3\\_cowen\\_et\\_al.pdf?sequence=1](https://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/2771/20.3_cowen_et_al.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 15 mar 2011.

COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, v.1, p.443–466. 2009. Disponível em: <[http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST\\_010809/Cowen\\_etal\\_2009.pdf](http://www.icess.ucsb.edu/~satoshi/archive/documents/OIST_010809/Cowen_etal_2009.pdf)>. Acesso em: 15 mar 2011.

CRAIG, M. T. et al. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*, v.7, p.167-174. 2009. Disponível em: <<http://www.int-res.com/articles/esr2008/theme/Goliath/goliathpp1.pdf>>. Acesso em: 5 may 2011.

DOMINGUES, V. S. et al. Historical population dynamics and demography of the eastern Atlantic pomacentrid *Chromis limbata* (Valenciennes, 1833). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.40, p.139-147. 2006. Disponível em: <<http://www.ispa.pt/ui/uie/pdf/Domingues%20etal%202006.pdf>>. Acesso em: 7 oct 2010.

DOMINGUES, V. S. et al. Phylogeography and demography of the Blenniid *Parablennius parvicornis* and its sister species *P. sanguinolentus* from the northeastern Atlantic Ocean and the western Mediterranean Sea. Short Communication. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.46, p. 397-402. 2008. Disponível em: <<http://www.ispa.pt/ui/uie/pdf/domingues2008a.pdf>>. Acesso em 15 feb 2011.

FARIAS, I. P. et al. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, v.53, p.89-103. 2001. Disponível em: <[www.springerlink.com/index/D670XMDTU38RY677.pdf](http://www.springerlink.com/index/D670XMDTU38RY677.pdf)>. Acesso em: 13 mar 2011.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, v.143, p.1919–1927. 2010. Disponível em: <[http://extras.ufg.br/uploads/102/original\\_Frankham\\_2010.pdf](http://extras.ufg.br/uploads/102/original_Frankham_2010.pdf)>. Acesso em: 14 july 2010.

FREELAND, J. R. *Molecular Ecology*. John Wiley; Sons Ltd, West Sussex, 2005. 388p. Disponível em: <<http://mirror.lib.unair.ac.id/bahan/EFOLDER/Molecular%20Ecology.pdf>>. Acesso em: 10 oct 2009.

GARBER, A. F. et al. Population Structure and Variation in Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Coast of Florida as Determined from Mitochondrial DNA Control Region Sequence. *Marine Biotechnology*, v.6, n.2, p.175–185. 2004. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/population-structure-and-variation-in-red-snapper-lutjanus-campechanus-from-the-gulf-of-mexico-and-atlantic-coast-of-florida-as-determined-from-mitochondrial-dna-control-region-sequence/>>. Acesso em: 12 feb 2010.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, v.89, p.998-1006. 1994.

HAUSER, L.; CARVALHO, G. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, v.9, p.333-362. 2008. Disponível em: <[http://www.fish.washington.edu/research/alaska/publications/ASP\\_Papers/Hauser%20%26%20Carvalho%2008%20Paradigm%20shifts.pdf](http://www.fish.washington.edu/research/alaska/publications/ASP_Papers/Hauser%20%26%20Carvalho%2008%20Paradigm%20shifts.pdf)>. Acesso em: 12 oct 2010.

JORGENSEN, H. B. H. et al. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, v.14, p.3219–3234. 2005. Disponível em: <[http://myweb.dal.ca/ruzzante/pubs/Jorgensen%20et%20al%20MOL%20ECOL%20\(in%20press\)%202005.pdf](http://myweb.dal.ca/ruzzante/pubs/Jorgensen%20et%20al%20MOL%20ECOL%20(in%20press)%202005.pdf)>. Acesso em: 5 nov 2010.

KULLANDER, S. O. et al. Phylogenetic relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South America based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v.48, n.3, p.248-258. 2010.

LUQUE, C. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, v.136, n.3, p.251–253. 2002.

MEYER, W. et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.9, p.2274-2280. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265746/pdf/jcm00021-0040.pdf>>. Acesso em 12 nov 2010.

McCARTNEY, M.A. et al. Genetic mosaic in a marine species flock. *Molecular Ecology*, v.12, p.2963–2973. 2003. Disponível em: <[http://striweb.si.edu/bermingham/Publications/papers/biff\\_papers/EB,%20Marfish%20Hypoplectrus%20ME03.pdf](http://striweb.si.edu/bermingham/Publications/papers/biff_papers/EB,%20Marfish%20Hypoplectrus%20ME03.pdf)>. Acesso em: 2 feb 2011.

NIELSEN, E. E. et al. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. *Molecular ecology*, v.18, n.15, p.3128-3150. 2009.

PALUMBI, S. et al. *The simple fool's guide to PCR*: version 2. University of Hawaii, 2002.

PAMPOULIE, C. et al. Evidence for fine-scale genetic structure and estuarine colonization in a potential high gene flow marine goby (*Pomatoschistus minutus*). *Heredity*, v.92, p.434–445. 2004. Disponível em: <<http://www.vliz.be/imisdocs/publications/56253.pdf>>. Acesso em 23 jan 2011.

PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. 343-380p. In: Cullen Jr. et al. *Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre*. Curitiba: UFPR, 2004. 665p.

PRODOCIMO, V. et al. Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along Brazilian coast. *Journal of Fish Biology*, v.73, p.2075-2082. 2008. Disponível em: <[http://www.gia.org.br/sistema/up\\_fck/Trabalhos/robalo.pdf](http://www.gia.org.br/sistema/up_fck/Trabalhos/robalo.pdf)>. Acesso em 1 apr 2011.

PUEBLA, O. et al. Population genetic analyses of *Hypoplectrus* coral reef fishes provide evidence that local processes are operating during the early stages of marine adaptive radiations. *Molecular Ecology*, v.17, p.1405-1415. 2008. Disponível em: <[http://striweb.si.edu/bermingham/Publications/papers/biff\\_papers/2008\\_Puebla\\_etal\\_wBermingham.pdf](http://striweb.si.edu/bermingham/Publications/papers/biff_papers/2008_Puebla_etal_wBermingham.pdf)>. Acesso em 5 ago 2010

REDDY, M. P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v.128, p.9-17. 2002. Disponível em: <[http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/Interno/pr\\_otocolos/issr/PradeepSarlaSiddiq\\_2002\\_PolimorfismoDelssryAplicaciones.pdf](http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/Interno/pr_otocolos/issr/PradeepSarlaSiddiq_2002_PolimorfismoDelssryAplicaciones.pdf)>. Acesso em: 3 nov 2010.

ROUX, O. et al. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.43, p.240–250. 2007. Disponível em: <[http://www.ecolab.ups-tlse.fr/IMG/pdf/MPE\\_Roux2007.pdf](http://www.ecolab.ups-tlse.fr/IMG/pdf/MPE_Roux2007.pdf)>. Acesso em: 27 oct 2010.

SEKINO, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v.233, n.1-4, p.163-172. 2004.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, v.47, n.1, p.264–279. 1993. Disponível em: <[http://filogeografia.dna.ac/PDFs/popgen/Slatkin\\_93\\_Isoln\\_by\\_Distance.pdf](http://filogeografia.dna.ac/PDFs/popgen/Slatkin_93_Isoln_by_Distance.pdf)>. Acesso em: 30 jan 2011.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Ribeirão Preto, 2001. p.172-192.

SOUZA, G. A. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.43, n.7, p.843-849. 2008.

SYKES, B. *As Sete Filhas de Eva*. A ciência que revela nossa herança genética. Rio de Janeiro, Record: 2003.

TREML, E. A. et al. Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecology*, v.23, p. 19-36. 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/vx6q801240166330/>>. Acesso em: 5 fev 2010.

UTTER, F. M. Biochemical Genetics and Fisher Management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology*, 39: 1-20. 1991.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzimoly*, v. 395, p.134-144. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668790595009X>>. Acesso em: 12 jan 2011.

ZIETKIEWICZ. E. et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics*, New York, v.20, p.176-183. 1994.

**Benevides, Emilly Anny**

**Diversidade genética, conectividade populacional e a conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; Perciformes Epinephelidae) na costa atlântica da América do Sul / Emilly Anny Benevides. – Recife: O Autor, 2011.**

**92 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Rodrigo A. Torres**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2011.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Peixe - Pesquisa 2. Genética de populações 3. Espécies em extinção I. Título.**

**597**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-203**