



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE – PPGSHMA**

Maria Luiza Valões Cardoso

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO CAVALO-MARINHO
HIPPOCAMPUS REIDI NO LITORAL DO NORDESTE
DO BRASIL**

Vitória de Santo Antão

2016

Maria Luiza Valões Cardoso

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO CAVALO-MARINHO
HIPPOCAMPUS REIDI NO LITORAL DO NORDESTE
DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientadoras: Dra. Ana Cristina Lauer Garcia

Dra. Rosana Beatriz Silveira

Coorientador: Dr. Martín Alejandro Montes

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

C263d Cardoso, Maria Luiza Valões
Diversidade genética do cavalo-marinho *hippocampus reidi* no litoral do nordeste do Brasil / Maria Luiza Valões Cardoso. - 2016.
xvi + 64 folhas: il.; color.

Orientadora: Ana Cristina Lauer Garcia

Orientadora: Rosana Beatriz Silveira

Coorientador: Martín Alejandro Montes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa e Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Cavalo marinho. 2. Biologia marinha. I. Garcia, Ana Cristina Lauer (Orientadora). II. Silveira, Rosana Beatriz (Orientadora). III. Montes, Martín Alejandro (Coorientadora). IV. Título.

597.6798 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-048/2016



Dissertação de Mestrado apresentada por **Maria Luiza Valões Cardoso** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CAVALOS-MARINHOS *HIPPOCAMPUS REIDI* NO LITORAL DO NORDESTE DO BRASIL**", orientada pela Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lauer Garcia e Prof.^a Dr.^a Rosana Beatriz Silveira e coorientada pelo Prof. Dr. Martin Alejandro Montes, aprovada no dia 02 de março de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Carlos Daniel Pérez
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr. José Eduardo Garcia
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr.^a Rita de Cássia de Moura
Departamento de Biologia – UPE

Autora

Maria Luiza Valões Cardoso

A minha filha Helena Valões Alexandre, fonte de
minha inspiração, força e determinação em
todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar e iluminar durante todo o desenvolvimento deste trabalho e ter-me dado coragem e vontade de seguir mesmo quando os caminhos pareciam adversos.

Ao meu marido Amaro Alexandre por todo seu amor, paciência, dedicação e por me apoiar incondicionalmente. Você é meu porto seguro, meu alicerce e minha fortaleza.

A minha amada e linda filha Helena Valões Alexandre que é e sempre será a minha maior força e coragem em todos os momentos da minha vida. Você filha é a minha luz e por isso dedico todo meu esforço e amor.

A minha família linda e abençoada, em especial aos meus pais João Luiz Monteiro Cardoso e Maria de Fátima Valões Cardoso por ter me apoiado e abraçado em todos os momentos felizes e difíceis da minha vida pessoal e profissional, aconselhando e fazendo o possível para me verem realizada e feliz – Eu amo vocês infinitamente!!

Aos meus irmãos Jader Filipe e João Luiz Júnior pela eterna união e apoio na minha vida, por compartilhar as alegrias, risadas e dificuldades e por muitas vezes serem meu exemplo de determinação.

A minha sogra Iara Melo e ao meu sogro Antônio Alexandre por terem carinhosamente me ajudado em muitos momentos difíceis da minha trajetória acadêmica – Meu muito obrigada!!

Aos meus amigos, em especial a minha amiga Flávia Pina pelos conselhos e carinho.

Agradeço enormemente a minha orientadora Profa. Dra. Ana Cristina Lauer Garcia por ter me aceitado como orientanda de forma tão gentil e educada, por me auxiliar neste trabalho com toda sua disposição. Obrigada Ana!!

A minha orientadora Dra. Rosana Beatriz Silveira e ao Projeto Hippocampus pelo carinho em me auxiliar durante toda a pesquisa com os cavalos-marinhos.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Martín Alejandro Montes por sua preocupação e dedicação para que eu pudesse realizar um bom trabalho e por toda paciência diária nas atividades e estudos do laboratório.

A toda a equipe do laboratório Genoma da UFRPE, em especial aos meus colegas Erinaldo Santos, Gessica Dayane e Neto Carvalho por ter me acolhido tão bem e por ter auxiliado nas dúvidas diárias que surgiam no laboratório.

Ao iniciação científica Carlos Campos, por ser meu braço direito nas minhas atividades do laboratório, por toda sua dedicação e empenho.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos meus colegas de curso que junto comigo travaram batalhas para conseguir o título de mestre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido uma bolsa de estudo, financiando o desenvolvimento do meu mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos.	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
CAPÍTULO 2	
Diversidade genética de <i>Hippocampus reidi</i> (Ginsburg), uma espécie de cavalo-marinho em perigo de extinção	20
2.1. Resumo	21
2.2 Introdução	22
2.3 Material e Métodos	23
2.4 Resultados	27
2.5 Discussão	31
2.6 Referências Bibliográficas	34
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Primeira Figura do Capítulo 1: Fêmea de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*). Fonte: Silveira (2005). 4
- Figura 1.2 Segunda Figura do Capítulo 1: Mapa mundial destacando, em vermelho, a distribuição geográfica do gênero *Hippocampus*. Fonte: Modificado de Lourie *et al.* (1999). 5
- Figura 1.3 Terceira Figura do Capítulo 1: A. *Hippocampus erectus*; B–C. *H. reidi*; D. *H. patagonicus*. Fonte: Silveira *et al.* (2014). 6
- Figura 1.4 Quarta Figura do Capítulo 1: Representação esquemática da vista lateral do cavalo-marinho macho e fêmea. Fonte: Modificado de Lourie *et al.* (2004). 7
- Figura 1.5 Quinta Figura do Capítulo 1. Bolsa incubadora (BI) do macho de *Hippocampus reidi* nos primeiros anéis da cauda (CA). Fonte: Silveira (2005). 8
- Figura 1.6 Sexta Figura do Capítulo 1: A. *Hippocampus reidi* com apêndices cutâneos mimetizando algas. B. *H. bargibanti* mimetizando pólipos de corais. Fonte: Silveira (2005). 11
- Figura 1.7 Sétima Figura do Capítulo 1: Representação esquemática da técnica de ISSR. Na parte superior das figuras está representada uma sequência de DNA com duas regiões de microssatélites (letras vermelhas). Os nucleotídeos em amarelo destacados nesta sequência se referem aos pontos de ancoragem dos *primers* (retângulos com fundo marrom) A) Identificação da região alvo, seguida pelo anelamento dos *primers* e posterior amplificação do DNA, permitindo a visualização de uma banda em um gel de agarose. B) Quando há mutação o *primer* não se anela em uma das fitas do DNA e a amplificação ocorrerá em apenas uma região da fita. A quantidade de DNA gerada nesta situação será insuficiente para visualizar a banda no gel. 18

- Figura 2.1 Primeira Figura do Capítulo 2: Mapa da América do Sul, com destaque para o Brasil e para a região Nordeste deste país. Esta região aparece ampliada e com a indicação (setas) dos pontos de amostragem dos cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi*. 24
- Figura 2.2 Segunda Figura do Capítulo 2: Árvore de Neighbor-Joining para *Hippocampus reidi* utilizando o modelo de número de diferenças. PEAD=Indivíduos adultos da população de Pernambuco (em verde), FIPE= Juvenis da população de Pernambuco (em azul), CEAD=Indivíduos adultos da população de Ceará (em vermelho). 28
- Figura 2.3 Terceira Figura do Capítulo 2: Gráfico dos valores de delta K para determinar o número ideal de grupos entre as amostras de *Hippocampus reidi* analisadas, constituídas por indivíduos adultos e juvenis de Pernambuco e indivíduos adultos de Ceará, usando quatro primers de ISSR e o método de Evanno no software STRUCTURE. 29
- Figura 2.4 Quarta Figura do Capítulo 2: Análise de agrupamento Bayesiano de 158 amostras de *Hippocampus reidi* realizada com o software STRUCTURE para o modelo K=2. Cada barra vertical corresponde a um único indivíduo. O comprimento de cada cor é proporcional ao coeficiente de adesão estimado. De 1 a 29 - Indivíduos adultos de Ceará; de 30 a 59 - Indivíduos adultos de Pernambuco e de 60 a 158 – Juvenis da população de Pernambuco. 30
- Figura 2.5 Quinta Figura do Capítulo 2: Distribuição de *mismatch* (par a par) observada e esperada para os indivíduos de *Hippocampus reidi* provenientes de Pernambuco (adultos e juvenis) e Ceará (adultos) de acordo com o modelo de crescimento populacional. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Primeira Tabela do Capítulo 2: Populações de <i>Hippocampus reidi</i> estudadas, número de indivíduos (N) e número de bandas polimórficas para os quatro primers de ISSR investigados.	27
Tabela 2.2	Segunda Tabela do Capítulo 2: Distância genética em <i>Hippocampus reidi</i> do litoral do Nordeste do Brasil medida com marcadores de ISSR. A distância genética foi calculada como a média do número de diferenças par a par. Nas células com fundo cinza está indicada a distância intrapopulacional e nas células com fundo branco a distância interpopulacional.	27
Tabela 2.3	Terceira Tabela do Capítulo 2: Análise da variância molecular (AMOVA) para 158 indivíduos de <i>Hippocampus reidi</i> pertencentes às populações de Pernambuco (adultos e juvenis) e de Ceará (adultos) usando quatro primers de ISSR. GL= graus de liberdade	29

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igualdade
°	Grau
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMOVA	Análise Molecular da Variância
BI	Bolsa incubadora
Bp	Pares de bases
CA	Cauda
CEAD	Indivíduos Adultos da População de Ceará
CITES	Conservação Internacional sobre o Comércio de espécies ameaçadas da Fauna e da Flora Selvagem
cm	Centímetro
COI	Citocromo oxidase subunidade I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FIPE	Juvenis da População de Pernambuco
GL	Grau de liberdade
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
IUCN	Internacional União para Conservação da Natureza
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Km	Quilômetro
LABAQUAC	Laboratório de Aquicultura Marinha
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MMA	Misnistério do Meio Ambiente
mm	Milímetro
mM	Millimolar
mtDNA	Mitochondrial DNA
μM	Micromolar
μl	Microlitro
Ng	Nanograma
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PEAD	Indivíduos Adultos da População de Pernambuco
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
U	Unidade

RESUMO

No Nordeste do Brasil *Hippocampus reidi* é o cavalo-marinho de mais ampla distribuição geográfica e está ameaçado de extinção pelos efeitos antrópicos. No estuário do rio Maracáipe no estado de Pernambuco, há alguns anos considerado um “santuário” para esta espécie, já não é possível observá-la em algumas amostragens. Esta localidade vem sendo monitorada desde a criação do “Projeto Hippocampus”, há mais de 15 anos, uma instituição não governamental que visa à conservação dos cavalos-marinhos. Neste trabalho, visando à recuperação da população de Pernambuco, investigamos a diversidade genética de 30 adultos e 99 juvenis desta localidade e de 29 adultos coletados no Parque Nacional de Jericoacora, no estado do Ceará, onde os dados do “Projeto Hippocampus” apontam para uma população demograficamente saudável. Para a análise da diversidade genética foram utilizados quatro *primers* de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs). Por esta metodologia a finalidade deste estudo foi decidir qual o melhor caminho para a recuperação da população de Maracáipe: 1) a translocação de indivíduos coletados no Ceará para Pernambuco, ou 2) a reprodução em cativeiro dos indivíduos de Pernambuco, com a introdução dos juvenis na natureza. Nossos resultados mostraram que todos os fragmentos amplificados foram polimórficos entre os grupos estudados. A menor diferenciação genética foi observada para os adultos e juvenis de Pernambuco. O dendograma com o algoritmo de Neighbor-joining e o modelo de número de diferenças apresentou um grupo com os indivíduos do Ceará e outro com adultos e juvenis de Pernambuco. A análise de Evanno apresentou um delta K maior para dois grupos e a presença destes dois grupos foi confirmada pelo software Structure. A análise molecular da variância mostrou que mais de 30% das diferenças ocorrem entre esses dois grupos. Nossos resultados apontam que a melhor estratégia conservacionista para as duas populações estudadas é a reprodução em cativeiro dos indivíduos de Pernambuco e a posterior soltura dos animais na natureza.

Palavras-Chave: ISSR, Maracáipe, Parque Nacional de Jericoacora, peixe.

ABSTRACT

In northeast Brazil *Hippocampus reidi* is the seahorse wider geographical distribution and is threatened of extinction by anthropogenic effects. In the estuary of the Maracaípe river in Pernambuco state, a few years ago considered a "sanctuary" for this species, is no longer possible to observe it in some samples. This locality has been monitored since the creation of "Hippocampus Project," for more than 15 years, a non-governmental institution which aims at conservation of seahorses. In this work, focusing on the recovery of Pernambuco population, we investigated the genetic diversity of 30 adults and 99 progenies from this location using four Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs) primers. We also analyzed by this methodology 29 adults collected in the Parque Nacional de Jericoacoara in Ceará state, a demographically healthy population according to "Hippocampus Project". Here evaluated the best way to recover Pernambuco population: 1) the translocation of individuals collected in Ceará for Pernambuco, or 2) captive breeding of Pernambuco seahorses and the introduction of offspring at this location. Our results showed that all the amplified fragments were polymorphic between groups. The smallest genetic differentiation was observed for adults and progenies of Pernambuco. The dendrogram with the Neighbor-joining algorithm and the number of differences model showed a group of Ceará and other with adults and progenies of Pernambuco. The Evanno analysis showed a higher delta K to two groups and this result was confirmed by Struture software. Analysis of Molecular Variance showed that over 30% of the differences occur between these two groups. Our results suggest that the best conservation strategy is the captive breeding of Pernambuco seahorses and the release of offspring to reinforce this population.

Key words: fish, ISSR, Maracaípe, Parque Nacional de Jericoacora.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os cavalos-marinhos são peixes ósseos pertencentes à família Syngnathidae e estão todos incluídos dentro do gênero *Hippocampus*. As mais de 50 espécies desse grupo estão distribuídas em todo o mundo, ocupando regiões tropicais e temperadas, sendo encontrados em águas litorâneas e estuarinas (LAURIE et al., 2004; FROESE; PAULY, 2015).

Atualmente os cavalos-marinhos sofrem sérios problemas de conservação, muitas vezes gerados por interferência antrópica, tais como a pesca excessiva, a contaminação e destruição de seus ambientes naturais, o seu uso para fins medicinais por algumas culturas e a intensa manipulação com finalidade turística (SILVEIRA, 2005). Tal situação tem levado a um grande decréscimo populacional destes organismos (LOURIE et al., 1999). Como uma medida para a preservação dos cavalos-marinhos, desde novembro de 2002 todas as espécies de *Hippocampus* foram adicionadas ao apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) onde estão mencionadas as espécies cujas populações selvagens estão ameaçadas, ou podem se tornar ameaçadas, pelo comércio internacional. Ao nível nacional, *H. reidi*, *H. erectus* e *H. patagonicus* são consideradas como vulneráveis à extinção (MMA 2014).

Nas últimas décadas, os estudos genéticos tornaram-se importantes ferramentas para avaliar a perspectiva de sobrevivência de espécies e populações ameaçadas de extinção. Baixa variabilidade genética sugere maior vulnerabilidade dos indivíduos frente às variações ambientais (FRANKHAN, 1995) e serve de alerta em estudos conservacionistas.

No Brasil, a população de *H. reidi* do litoral do estado de Pernambuco, em Maracaípe enfrenta sérios problemas de conservação. Esta localidade, considerada há quinze anos um “santuário” para esta espécie, vem sendo monitorada pelo “Projeto Hippocampus” desde 2001, sendo apontada uma notável diminuição de indivíduos desta população, chegando à zero em algumas amostragens (SILVEIRA et al., 2011).

Em vista dos problemas de conservação enfrentados pelos cavalos-marinhos o conhecimento da diversidade genética pode contribuir com a preservação de suas espécies e populações, gerando subsídios fundamentais para ações corretas de manejo (FRANKHAM et al., 2008). Para populações que estão em iminente risco de extinção, tal como ocorre para *H. reidi* de Maracaípe, qual seria a medida de conservação mais apropriada, o ingresso de indivíduos de outra população próxima ou o reforço da população

natural a partir da progênie de indivíduos desta mesma população reproduzidos em cativeiro? Esclarecimentos deste tipo são fundamentais em um país tão diverso e, ao mesmo tempo, com tantas espécies ameaçadas como o Brasil, constituindo-se na linha de frente da área da Genética da Conservação.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética de populações do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em áreas do litoral Nordeste do Brasil.

1.2.2. Objetivos específicos

-Qualificar e quantificar a diversidade genética das populações naturais de cavalos-marinhos de *H. reidi* do estuário do rio Maracápe em Pernambuco e do Parque Nacional de Jericoacora no estado do Ceará, bem como de uma população de cativeiro.

- Comparar a diversidade genética dentro e entre as populações estudadas a fim de verificar qual a estratégia de manejo mais adequada para a recuperação da população de *H. reidi* de Pernambuco: 1) a reprodução de indivíduos desta população em cativeiro e a liberação dos descendentes no ambiente natural ou 2) a translocação de indivíduos da população de Ceará para Pernambuco.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Taxonomia e distribuição geográfica dos cavalos-marinhos com destaque para as espécies que habitam a costa brasileira

Os cavalos-marinhos (Figura 1) são peixes ósseos pertencentes à classe Actinopterygii, ordem Syngnathiformes, e a família Syngnathidae. Esta família está dividida em duas subfamílias: Hippocampinae e Syngnathinae (NELSON, 1994). Todos os cavalos-marinhos estão incluídos no gênero *Hippocampus* (Hippocampinae) para o qual já foram catalogadas mais de 50 espécies no mundo (FROESE; PAULY, 2015)



Figura 1. Fêmea de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*). Fonte: Silveira (2005).

As espécies de cavalos-marinhos apresentam ampla distribuição mundial com provável origem há pelo menos 20 milhões de anos (FRITZSCHE, 1980; FOSTER; VINCENT, 2004). Os representantes deste grupo podem ser marinhos e estuarinos, sendo encontrados em águas de regiões tropicais e temperadas, entre as latitudes de 50° ao norte

até 50° ao sul (LAURIE et al., 2004), Figura 2. Normalmente habitam ambientes costeiros, como recifes, baías, bancos de algas marinhas, mangues e lagoas (FOSTER; VINCENT, 2004; GOFFREDO et al., 2004; WILLADINO et al., 2012).



Figura 2. Mapa mundial destacando, em vermelho, a distribuição geográfica do gênero *Hippocampus*. Fonte: Modificado de Lourie et al. (1999).

No Brasil ocorrem três espécies de cavalos-marinhos: *H. reidi*, *H. erectus* e *H. patagonicus* (SILVEIRA et al., 2014), Figura 3. Destas, *H. reidi* é conhecida como a espécie de “focinho longo” e ocorre no continente americano nas águas dos Estados Unidos, Bermuda, Bahamas, Cuba, Haiti, Belize, Panamá, Jamaica, Barbados, Granada, Colômbia, Venezuela, Brasil e Argentina (VARI, 1982; LOURIE et al., 1999; PIACENTINO, 2008; BOEHM et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014). Na costa brasileira esta é a espécie de mais ampla distribuição geográfica ocorrendo em todos os dezessete estados banhados pelo oceano Atlântico (SILVEIRA, 2011).

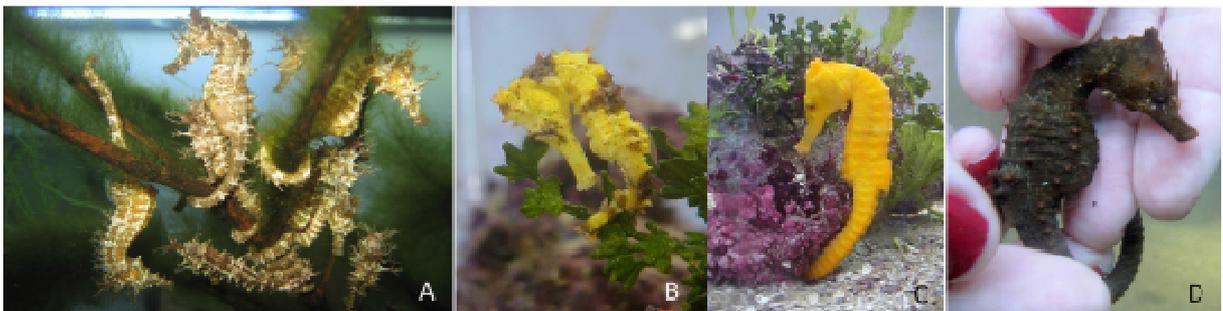


Figura 3. A. *Hippocampus erectus*; B–C. *H. reidi*; D. *H. patagonicus*. Fonte: Silveira et al. (2014).

Hippocampus erectus, conhecido como cavalo-marinho raiado, apresenta distribuição geográfica nas águas do continente americano, na costa do Canadá, Estados Unidos, Bermuda, Bahamas, Cuba, Haiti, Caribe, Ilhas Leeward, México, Guatemala, Belize, Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil, Uruguai e Argentina (VARI, 1982; LOURIE et al., 1999; PIACENTINO, 2008; BOEHM et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014). A espécie também foi registrada na Europa, no arquipélago português de Açores (WOODAL et al., 2009). No Brasil ocorre na costa da região Nordeste, Sudeste e Sul do país (SILVEIRA, et al., 2014).

A espécie *H. patagonicus* pode ser encontrada na costa da Argentina e do Brasil (PIACENTINO; LUZZATTO, 2004; BOEHM et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014). Por apresentar características muito semelhantes a *H. erectus* como, por exemplo, o focinho de comprimento curto, *H. patagonicus* foi durante muitas décadas, identificado como *H. erectus* no Brasil. Essa confusão taxonômica foi resolvida por Silveira et al., (2014), a partir de análises morfológicas e moleculares com um grande número de amostras de *Hippocampus* coletadas ao longo da costa brasileira, esclarecendo o número de espécies que habitam esta área.

1.3.2 Aspectos morfológicos dos cavalos-marinhos

Os representantes do gênero *Hippocampus* apresentam a cabeça posicionada em ângulo reto em relação ao eixo do corpo, tronco curvado, ausência de nadadeira caudal e presença de cauda preênsil (LOURIE et al., 2004). A cauda preênsil permite que as espécies desse gênero utilizem vários componentes do ambiente como ponto de apoio e ancoragem (LOURIE et al., 1999; DIAS et al., 2002; ROSA et al., 2002).

O esqueleto dos cavalos-marinhos é altamente modificado, coberto por uma série de segmentos ósseos que, em conjunto, formam anéis em torno do tronco e da cauda, Figura 4 (KUITER, 2001; LOURIE et al., 2004). As placas ósseas são articuladas na cauda, mas estão entrelaçadas formando um esqueleto completo externo no tronco. Algumas espécies apresentam protuberâncias ósseas ou filamentos de pele que se formam a partir dos anéis ósseos (NORMAN; GREENWOOD, 1975).

O peso dos cavalos-marinhos varia de acordo com o estágio reprodutivo, aumentando, consideravelmente, nas fêmeas que estão carregando ovócitos e nos machos que estão gestantes. O comprimento dos adultos varia entre as diferentes espécies, desde

menos de dois cm, em *H. denise*, até 35 cm em *H. abdominalis* (LOURIE et al., 2004). A altura de *H. reidi* varia de aproximadamente sete até quase 19 cm (SIVEIRA et al., 2014).

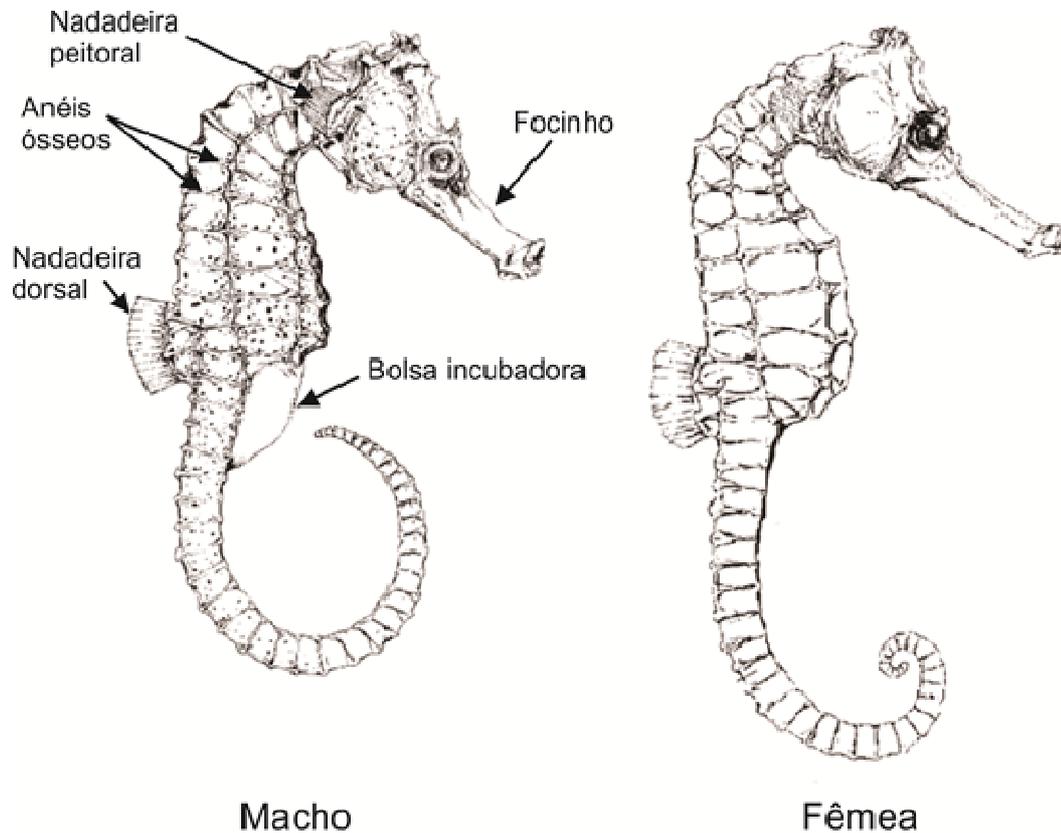


Figura 4. Representação esquemática da vista lateral do cavalo-marinho macho e fêmea. Fonte: Modificado de Lourie et al. (2004).

As proporções corporais sofrem mudanças ao longo da vida. Em comparação com adultos da mesma espécie, os juvenis têm cabeças maiores em relação a seus corpos e são mais magros (LOURIE et al., 2004).

1.3.3 Aspectos reprodutivos dos cavalos-marinhos

Os cavalos-marinhos apresentam características bastante peculiares em relação à reprodução. A fêmea é responsável pela produção dos ovócitos e os machos pela gestação dos juvenis. Os ovócitos são depositados dentro da bolsa incubadora do macho, Figura 5, onde são fertilizados e recebem proteção, nutrição e ambiente favorável para

desenvolvimento dos juvenis (SILVEIRA, 2000, LOURIE et al., 2004; STOLTING; WILSON, 2007).

A gestação dura entre nove e 45 dias, dependendo da espécie, sendo a duração influenciada pela temperatura da água. Temperaturas mais elevadas diminuem o tempo necessário para o desenvolvimento dos juvenis (FOSTER; VINCENT, 2004; SILVEIRA, 2010).

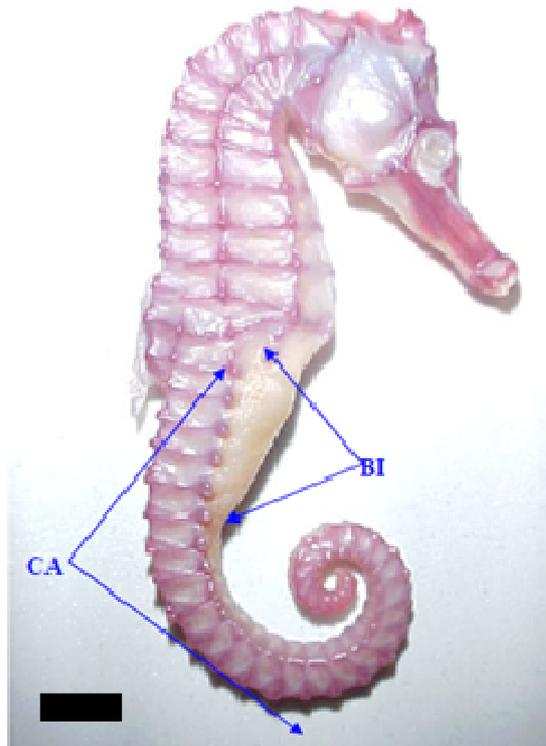


Figura 5. Bolsa incubadora (BI) do macho de *Hippocampus reidi* nos primeiros anéis da cauda (CA). Fonte: Silveira (2005). Barra=2 cm.

O tamanho da ninhada varia de acordo com a espécie e o tamanho corporal do macho, em geral, machos maiores produzem mais juvenis e chegam a liberar entre cinco e 2.000 alevinos. Quando nascem, os cavalos-marinhos parecem adultos em miniatura e variam em comprimento entre dois e 12 mm. Os recém-nascidos não recebem cuidado parental (SILVEIRA, 2000; FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004).

O início da vida adulta nos machos da maioria das espécies pode ser reconhecido pela presença de uma bolsa de incubação totalmente desenvolvida (Figuras 4 e 5), o que ocorre em cerca de quatro meses a um ano, dependendo das espécies (LOURIE et al., 2004). De acordo com Foster; Vincent (2004), o desenvolvimento da bolsa incubadora pode

não ser um indicativo de maturidade fisiológica, como constatado em *H. trimaculatus* que desenvolve bolsa entre 8,0 e 9,0 cm de altura e matura sexualmente somente aos 12 cm, comprovado pela análise histológica dos testículos. Apesar de ser o macho quem geste os juvenis, os papéis sexuais em cavalos-marinhos são considerados convencionais e não invertidos, uma vez que os machos competem pelo acasalamento e cortejam as fêmeas (VINCENT, 1994).

Os machos de todas as espécies de cavalos-marinhos que foram investigadas passam por mais de uma gravidez em um mesmo período reprodutivo. A época de reprodução varia com a localização da população, e parece ser influenciada por parâmetros ambientais, tais como luz, temperatura e estação das chuvas (LOURIE et al., 2004; SILVEIRA, 2005).

Algumas espécies de cavalos-marinhos compartilham características em comum como os rituais de acasalamento, porém dentro da mesma espécie podem apresentar taxas de fertilidade, fecundidade e tamanho de recém-nascidos diferentes com base na região geográfica em que os indivíduos vivem (SILVEIRA; FONTOURA, 2010).

Para todas as espécies de *Hippocampus* já estudadas, o macho recebe os ovócitos de uma única fêmea, durante um único evento de reprodução (FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004). A monogamia apresenta-se variável, em algumas espécies dura pelo menos uma temporada reprodutiva, já em outras pode ocorrer troca de parceiros. Um comportamento de reforço para manutenção do par formado é relatado através de saudações diárias que se estendem para namoros uma vez que o macho dá à luz (LOURIE et al., 2004).

A monogamia é assinalada como um fator limitante na taxa de reprodução da fêmea, pois pode ocorrer de a fêmea liberar grande quantidade de ovócitos que extrapolam a capacidade da bolsa incubadora do macho. Já a taxa reprodutiva dos machos é determinada pela extensão do período de gestação e pela limitação física da bolsa incubadora na recepção de ovócitos e desenvolvimento dos juvenis (VINCENT, 1994).

Em *H. reidi* os casais formados não aceitam o cortejo de outros indivíduos que tentem impedir a manutenção do par. Durante todo o período de gestação do macho, que dura entre 12 e 21 dias a fêmea permanece fiel. Uma vez que os juvenis são liberados da bolsa incubadora, no segundo dia, o macho volta a cortejar a fêmea e novos ovócitos são liberados em uma nova cópula (SILVEIRA, 2000). Para *H. reidi* foram registrados 1.572 indivíduos nascidos de um único macho, os indivíduos dessa espécie nascem em média com sete mm de altura e atingem a maturidade sexual com oito cm (VARI, 1982; VINCENT,

1990). Em águas tropicais brasileiras, *H. reidi* atinge maturidade sexual com altura média de 12,4 cm (SILVEIRA, 2005; MAI; ROSA, 2009).

1.3.4 Características alimentares e comportamentais de cavalos-marinhos

Os cavalos-marinhos alimentam-se de presas vivas, são animais de hábitos carnívoros (JAMES; HECK, 1994; FILLEUL, 1996; BERGERT; WAINWRIGHT, 1997). A alimentação ocorre por sucção, eles esperam a presa se aproximar da boca e, a partir de uma expansão do opérculo, criam uma pressão negativa que suga a presa para dentro do focinho. O sucesso desse evento é garantido graças à rapidez gerada durante o processo de sucção e a proximidade do alimento (FILLEUL, 1996; FOSTER; VINCENT, 2004).

As espécies do gênero *Hippocampus* raramente se aventuram em águas abertas para perseguir presas (FLYNN; RITZ 1999; KENDRICK; HYNDES, 2005). Em geral, se encontram ancorados com sua cauda preênsil sobre a vegetação ou o substrato, alimentando-se de pequenos crustáceos e larvas de peixes de forma eficaz e segura, evitando a predação (KENDRICK; HYNDES, 2005, KLEIBER et al., 2011; PORTER et al., 2013). Os cavalos-marinhos têm pouca capacidade de locomoção em comparação com outros peixes, nadando lentamente com postura ereta (LOURIE et al., 1999; TESKE; BEHEREGARAY, 2009).

O nado é realizado com a força propulsora de uma nadadeira dorsal e as nadadeiras peitorais garantem a direção e a estabilidade. As nadadeiras em cavalos-marinhos não fornecem força necessária para migrações distantes e as formas do corpo não são capazes de manter alta velocidade (MICHELLE, 1993). Estas características mostram que esses animais estão mais adaptados à manobra do que à velocidade do nado, dependendo, principalmente, da camuflagem como estratégia de defesa para evitar a detecção por predadores (HALE, 1996; CONSI et al., 2001; LOURIE et al., 2004).

Os cavalos-marinhos possuem alta capacidade de camuflagem, sendo capazes de mudar de cor e desenvolver filamentos dérmicos, que imitam a situação ambiental, sendo essa uma estratégia de defesa contra predação e para captura de presas (LOURIE et al., 1999; KUITER, 2000, 2001; FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004; SILVEIRA, 2005; KUITER, 2009). Mudanças de cor de curto prazo também podem ocorrer durante o namoro e outras interações intraespecíficas (KUITER, 2001; LOURIE et al., 2004). Algumas espécies são capazes de desenvolver projeções cutâneas que camuflam algas e até pólipos de corais, Figura 6 (LOURIE; RANDALL, 2003; SILVEIRA, 2005).

Para conseguir capturar o alimento *H. reidi* realiza algumas estratégias, o animal observa o substrato e, em seguida, direciona os olhos para a presa, inclinando o focinho e posicionando-o próximo à região ventral do corpo. Por natação, o animal estende o corpo e aproxima-se lentamente da presa, envolvendo sua cauda em torno do substrato, permitindo que se mova de maneira muito rápida e sugue a presa para dentro do focinho (FELÍCIO et al., 2006). Os adultos e jovens de *H. reidi* usam, principalmente, as raízes de *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como ponto de apoio e ancoragem, eventualmente podem ser avistados nos galhos caídos de mangue, macroalgas e substrato enlameado (ROSA et al., 2007).



Figura 6. A. *Hippocampus reidi* com apêndices cutâneos camuflam algas. B. *H. bargibanti* mimetizando pólipos de corais. Fonte: Silveira (2005).

Em áreas com pouca vegetação *H. reidi* assume o comportamento de sentar e esperar o momento certo para captura da presa. Esta espécie não se alimenta durante a noite, estando adaptada para capturar a presa ao amanhecer e entardecer (FELÍCIO et al., 2006).

1.3.5 Conservação dos cavalos-marinhos

Os cavalos-marinhos apresentam sérios problemas de conservação ocasionados pela exploração de suas populações naturais e pela destruição dos seus habitats. De acordo com Lourie et al (2004), estes organismos apresentam características biológicas que os tornam especialmente suscetíveis a problemas de conservação. Entre estas podemos citar: 1) A produção de poucos juvenis em relação a outras espécies de telósteos. 2) A gestação dentro da bolsa incubadora do macho, o que significa que o desenvolvimento da prole depende por muito mais tempo da sobrevivência do progenitor. 3) A monogamia na maioria das espécies estudadas, onde a falta de um indivíduo do par faz com que a reprodução cesse até que se encontre um novo parceiro, expondo-se, frequentemente a novos ambientes e predadores. 4) A baixa densidade populacional dificulta a formação de novos casais quando um dos indivíduos do casal é eliminado. 5) A baixa mobilidade dos adultos, podendo restringir a recolonização de áreas degradadas.

A interferência antrópica também tem causado sérios prejuízos para a conservação de cavalos-marinhos, sendo responsável pela diminuição das populações naturais. Neste contexto podemos citar a pesca abusiva destes peixes, bem como a perturbação dos ambientes onde vivem (ROSA et al., 2011). Todos estes fatores combinados levaram a uma diminuição entre 15 e 50% dos tamanhos populacionais em várias espécies (LOURIE et al., 2004).

O comércio mundial mobiliza mais de 20 milhões de cavalos-marinhos por ano, com as mais diferentes finalidades (VINCENT, 1996). Estes organismos são comercializados para usos medicinais, como alimentos estimulantes, como enfeites e como peixes ornamentais. Não há dados atualizados sobre os problemas de conservação dos cavalos-marinhos. Até 1995 havia 32 países que comercializavam estes peixes. No continente asiático, os dados são alarmantes, uma vez que o comércio de cavalos-marinhos secos ultrapassou 50 toneladas no ano 2000 (LOURIE et al., 2004). Há ainda o problema da captura acidental dos cavalos-marinhos durante a pesca não seletiva (LOURIE et al., 2004).

Na forma desidratada, o cavalo-marinho é utilizado como remédio caseiro (chá) para cura do cansaço, asma e câncer, entre outras doenças, em diversos locais do mundo, incluindo o Brasil, embora sem comprovação científica (VINCENT, 1996).

No Brasil, a pesca excessiva do cavalo-marinho ocorre em muitos estados, principalmente na região Nordeste do país (SILVEIRA, 2005). No Canal de Santa Cruz, em Pernambuco, milhares de cavalos-marinhos são retirados anualmente como fauna acompanhante durante a pesca de arrasto (SILVEIRA, 2011). Entre os anos de 1999 e 2000 para este estado, 4.114 cavalos-marinhos foram exportados, através de quatro empresas (IBAMA/PE, ofício 1016/2001).

Ainda em Pernambuco, no estuário do rio Maracaípe, antigamente conhecido como um “santuário” para estes peixes, há mais de 10 anos pescadores e jangadeiros realizam o “passeio do cavalo-marinho”. O passeio consiste em conduzir turistas até o local onde vivem estes animais, lá os cavalos-marinhos (*H. reidi*) são capturados e colocados em vidros. A captura dos animais independe da idade, do sexo ou se é macho grávido ou não. Após os turistas fotografarem, filmarem e alguns manusearem estes animais, os mesmos são devolvidos à água ou mantidos para serem visualizados na próxima visitação (SILVEIRA, 2005). Pesquisas realizadas pelo Projeto Hippocampus mostram que a densidade populacional dos cavalos-marinhos (*H. reidi*) vem diminuindo em Maracaípe, chegando à zero em algumas amostragens (SILVEIRA et al., 2011).

A degradação dos ambientes naturais onde vivem os cavalos-marinhos também representa um sério sinal de alerta para a sua conservação. Muitas regiões estuarinas brasileiras estão sendo contaminadas com efluentes provenientes de populações ribeirinhas e do comércio e das indústrias locais (SILVEIRA, 2005).

Dada a preocupação com a conservação dos cavalos-marinhos, desde novembro de 2002 todas as espécies de *Hippocampus* foram adicionadas ao apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*). Nesta relação estão incluídas as espécies para as quais as populações selvagens estão ameaçadas, ou podem se tornar ameaçadas, pelo comércio internacional. A inclusão de uma espécie nesta lista tem por objetivo assegurar que seu uso ocorrerá de forma sustentável (SILVEIRA, 2005).

Ao nível mundial, a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) classifica *H. erectus* como vulnerável a extinção, *H. reidi* como deficiente em dados e não menciona *H. patagonicus* (IUCN, 2015). Ao nível nacional estas três espécies são classificadas como vulneráveis a extinção (MMA, 2014).

1.3.6 Genética da conservação

A genética evolutiva se ramificou em diferentes campos, entre os quais, a genética da conservação, que consiste no uso da teoria e de técnicas da genética que contribuem para avaliar e reduzir o risco de extinção das espécies. Os estudos genéticos podem ajudar no conhecimento da diversidade que as espécies ou populações possuem e, assim, auxiliar a mantê-las como entidades dinâmicas capazes de se adaptar às mudanças ambientais. Este é um dos principais enfoques da biologia da conservação, permitindo a tomada de decisões corretas no manejo de espécies e populações em risco de desaparecerem

(FRANKHAM et al., 2002, 2008). Os principais focos da genética da conservação abordam os efeitos da endogamia, perda da diversidade genética, fragmentação das populações, redução do fluxo gênico, manejo genético de espécies ameaçadas, resolução taxonômica e avaliação das unidades de manejo (FRANKHAM et al., 2008).

Muitas pesquisas voltadas à genética da conservação estudam os efeitos da estruturação populacional, a fim de gerar conhecimentos visando à sobrevivência em longo prazo de espécies em vias de extinção, auxiliando a proteger a biodiversidade (FRANKHAM et al., 2002; WAN et al., 2004). O declínio do tamanho populacional leva ao surgimento de endogamia e a perda de diversidade genética, resultando em riscos elevados de extinção (WAN et al., 2004).

A genética de pequenas populações é dominada, principalmente, pela deriva e pela endogamia. A deriva consiste na flutuação aleatória das frequências alélicas ao longo do tempo, onde alelos adaptativos podem ser perdidos e alelos deletérios podem se fixar na população (OUBORG et al., 2010).

Em populações pequenas com um grande número de cruzamentos endogâmicos, ocorre aumento da frequência de homozigotos. Essa situação leva a um aumento da expressão de alelos recessivos, muitos dos quais são deletérios, podendo comprometer o potencial adaptativo da população. Uma vez que a endogamia não afeta as frequências alélicas da população, esta não é considerada um fator evolutivo. No entanto, ao aumentar a homozigose, a endogamia expõe os alelos recessivos aos efeitos da seleção natural (OUBORG et al., 2010).

A degradação dos ambientes naturais, muitas vezes devido ao crescente impacto da interferência antrópica, tem levado a uma alarmante perda de biodiversidade (DIRZO; RAVEN, 2003; FRANKHAM et al., 2008; CARDINALE et al., 2012; MATIOLI; FERNANDES, 2012). A extinção de espécies é uma perda imensurável, porque cada espécie contém informações genéticas únicas, moldadas por complexas interações ecológicas ao longo de milhões de anos de evolução (GALINDO-LEAL; GUSMÃO-CÂMARA, 2005).

As espécies ameaçadas de extinção muitas vezes necessitam de intervenções diretas que assegurem a sua sobrevivência. Os estudos genéticos podem auxiliar na recuperação de populações pequenas com elevado risco de extinção. Planos de manejo adequados dependem de informações genéticas, as quais poderão responder, por exemplo, se a recuperação de uma população ameaçada deverá ser feita a partir da introdução de migrantes de outras populações ou através da recuperação desta população com a criação de reprodutores em cativeiro (FRANKHAM et al., 2002, 2008).

O desenvolvimento de programas de manejo genético reconhece a importância de minimizar a perda da diversidade, monitorando e analisando os níveis de variabilidade nas populações de espécies em perigo. A IUCN reconhece a necessidade de estudos de conservação nos níveis diversidade de ecossistemas, diversidade de espécies e de diversidade genética, sendo essa última um fator crucial na conservação das espécies (FRANKHAM et al., 2002, 2008).

A ideia central dos estudos de genética aplicada à conservação é a utilização de marcadores moleculares para avaliar a melhor estratégia de manejo a fim de evitar a perda de diversidade causada pelas atividades humanas (MATIOLI; FERNANDES, 2012).

1.3.7 Marcadores moleculares aplicados à genética da conservação

As técnicas moleculares apresentam potenciais aplicações em estudos de genética da conservação de diferentes organismos, incluindo peixes. São ferramentas que ajudam a compreender padrões filogenéticos, filogeográficos, de fluxo gênico, de estrutura de populações, de variação dentro e entre as populações; elementos bastante relevantes para a gestão de espécies ameaçadas de extinção (WAPLES, 1998; MOBLEY et al., 2011; WORDAL et al., 2011).

Na década de 70 houve o surgimento de metodologias capazes de decifrar as sequências de DNA, como eletroforese, reações de hibridação e sequenciamento, aliadas à implantação da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS et al., 1986). Estas metodologias disponibilizaram um potente arsenal tecnológico para as pesquisas científicas, utilizando as variações das sequências de DNA do núcleo ou de organelas (mitocôndrias ou cloroplastos) como marcadores informativos para diferentes estudos de genética da conservação (MATTEVI, 2003).

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) é realizada em estudos de genética da conservação com diferentes tipos de organismos (HILLIS et al., 1996; AVISE, 2000, 2009). Nos eucariontes multicelulares o genoma mitocondrial é haploide, circular, de tamanho pequeno, não recombinante e de herança materna (AVISE, 2000, 2009). Essas características tornam o mtDNA uma molécula que pode atuar como um relógio molecular, servindo para identificar linhagens e o tempo de divergência entre espécies. Essas particularidades, juntamente com sua taxa de evolução rápida, torna esta molécula útil para identificar a estrutura populacional e a variabilidade genética (AVISE, 1995, 2000, 2009; MOBLEY et al., 2011) .

Muitos trabalhos utilizam a técnica de sequenciamento em estudos de genética da conservação com peixes, inclusive com cavalos-marinhos (ALAM et al., 2014; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Exemplos são ilustrados pelas investigações de regiões do mtDNA, revelando a estrutura genética de diferentes espécies destes organismos (GOSWAMI et al., 2009; FEDRIZZI et al., 2015). Nestes peixes, o sequenciamento direto dos genes do mtDNA, como o COI, também vem sendo utilizado na identificação ao nível de espécie (HENRIKSSON et al., 2012). Este mesmo marcador permitiu a definição de três espécies de cavalos-marinhos na costa do Brasil (SILVEIRA et al., 2014). Esses esforços são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação abrangentes.

Além de marcadores mitocondriais, os nucleares também vêm sendo amplamente analisados em estudos de variação alélica (SCHAD et al., 2012), padrões de seleção e estrutura populacional (SCHAD et al., 2011), associação com infecção viral e parasitária (FROESCHKE; SOMMER, 2012), análises filogenéticas (MUSOLF et al., 2004) e estudos de associação com doenças (UEDA et al., 2003). Algumas dessas análises são empregadas em pesquisas com diferentes espécies de peixes conforme descrito a seguir.

Estudos com genes nucleares e mitocôndriais utilizando marcadores como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) são bem empregados para avaliar as relações filogenéticas, filogeografia e determinar a diversidade genética entre distintas populações, incluindo espécies de peixes (DURNA et al., 2010; DAŞTAN et al., 2012). Esta metodologia consiste na utilização de enzimas de restrição que geram fragmentos de DNA. Estes fragmentos são separados por diferenças de tamanhos e visualizados pela hibridização destas sequências com compostos que emitem luminescência em luz ultravioleta (FALEIRO, 2007).

Os marcadores isoenzimáticos permitem a visualização da variação alélica de mutações não silenciosas. Essa técnica é empregada em estudos de biologia evolutiva (FALEIRO, 2007; MATIOLI; FERNANDEZ, 2012). Em peixes do gênero *Hypostomus* provenientes do rio Paraná essa metodologia permitiu a discriminação de três espécies, devido ao não compartilhamento de alelos em vários locos (PAIVA et al., 2005).

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consiste na amplificação de DNA genômico por PCR com o emprego de primers de sequências curtas. Essa técnica necessita de pequenas quantidades de DNA, apresenta rápida execução e baixo custo, permitindo a detecção de polimorfismos genéticos. Esta metodologia é recomendada para estudos de populações raras ou ameaçadas, possibilitando a investigação de qualquer espécie, com a utilização de *primers* arbitrários, sem a necessidade do conhecimento do

genoma a ser analisado (LACERDA et al., 2002; FALERIO, 2007; MATIOLI; FERNANDEZ, 2012). Em peixes, essa metodologia já foi empregada para avaliar as variações genéticas em populações do gênero *Prochilodus* (HATANAKA; GALETTI, 2003) e *Brycon* (WASKO; GALETTI, 2002) com diferentes impactos em seus ambientes naturais.

A metodologia de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) consiste na observação de diferenças no comprimento de fragmentos de DNA após a digestão com endonucleases de restrição. Essas diferenças são ocasionadas por mutações que criam ou retiram sítios de reconhecimento destas enzimas. A utilização dessa técnica não requer o conhecimento prévio da sequência de DNA. É uma técnica simples e rápida que pode fornecer um grande número de marcadores polimórficos (FALEIRO et al., 2001; FALEIRO, 2007; MATIOLI; FERNANDEZ, 2012). Essa metodologia tem sido utilizada para avaliar a genética de populações de várias espécies de peixes (HENRIKSSON et al., 2012, HAN et al., 2015).

Outros marcadores moleculares, tal como a metodologia de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) também são muito úteis em estudos genéticos, incluindo aqueles voltados à conservação (JIN; LI, 2007, GARAYALDE et al., 2011, LIU et al., 2013, DOMINGOS et al., 2014, ZHENG et al., 2015).

1.3.8 A metodologia de ISSR

A simplicidade e reprodutibilidade de um marcador molecular pode garantir seu sucesso de utilização. Os melhores marcadores para estudo genômicos, filogenéticos e de conservação apresentam boa relação entre o custo e a confiabilidade. Desde 1994, a metodologia de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) tem sido utilizada em estudos moleculares (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

A técnica de ISSR permite verificar polimorfismos entre loci de microssatélites. Nesta metodologia as sequências complementares para dois microssatélites vizinhos são usados como primers de PCR. Deste modo, a região variável entre estes microssatélites será amplificada de maneira estável e precisa (Figura 7). O tempo limitado de amplificação durante os ciclos de PCR impede a replicação excessiva de sequências longas de DNA contíguos. Como resultado uma variedade de cadeias de DNA será amplificada, as quais são geralmente curtas, mas muito variáveis em comprimento. O ISSR comporta-se como um marcador molecular dominante em indivíduos diploides. Os fragmentos gerados após a amplificação representam o genótipo dominante (heterozigoto ou homozigoto dominante) e

a ausência de um determinado fragmento de amplificação em um indivíduo representa o genótipo homocigoto recessivo (NAGAOKA; OGIHARA, 1997).

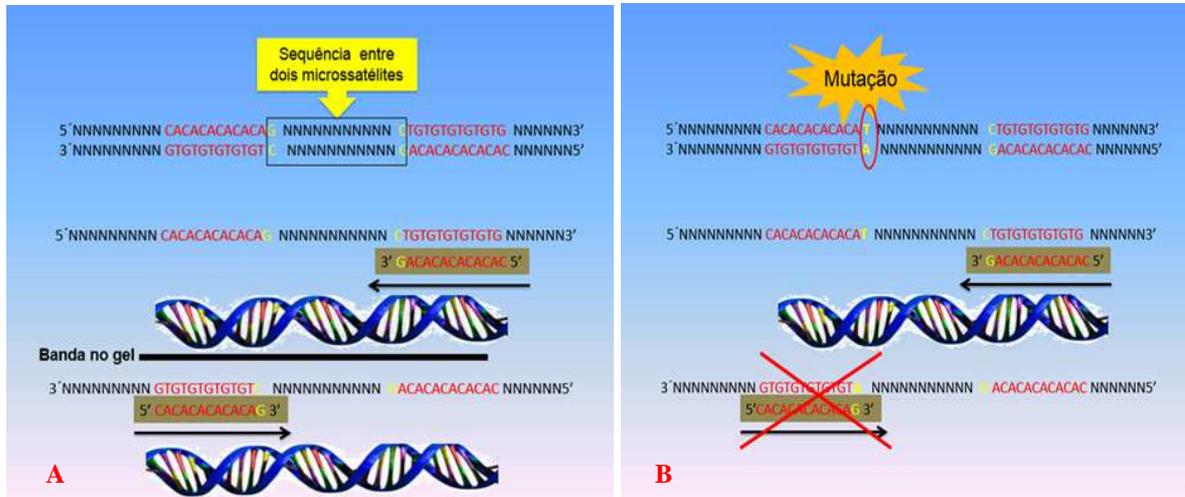


Figura 7. Representa o esquemática da técnica de ISSR. Na parte superior das figuras está representada uma seq ncia de DNA com duas regiões de microssatélites (letras vermelhas). Os nucleotídeos em amarelo destacados nesta seq ncia se referem aos pontos de ancoragem dos *primers* (retângulos com fundo marrom) A) Identifica o da região alvo, seguida pelo anelamento dos *primers* e posterior amplifica o do DNA, permitindo a visualiza o de uma banda em um gel de agarose. B) Quando há muta o o *primer* não se anela em uma das fitas do DNA e a amplifica o ocorrerá em apenas uma região da fita. A quantidade de DNA gerada nesta situa o será insuficiente para visualizar a banda no gel.

As vantagens do marcador de ISSR incluem sua alta taxa de replicabilidade, uma vez que os primers apresentam um local fixo de liga o, com o uso de âncoras que impedem o seu mau pareamento, sendo os primers anelados no limite do microssatélite, Figura 7. Outra vantagem   a possibilidade de análise da variabilidade de grande parte do genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seq ncia de DNA, o que torna essa metodologia um marcador universal e de fácil aplica o (ZIETKIEWICZ et al., 1994; TSUMARA et al., 1996; NAGAOKA; OGIHARA, 1997; BORNET; BLANCHARD, 2001).

Nos últimos anos a técnica de ISSR tem sido bastante utilizada em estudos visando estimar a diversidade genética de diferentes espécies e popula es (CANO et al., 2005; LU et al., 2006; ZHANG et al., 2006; ANTUNES et al., 2010; SANTOS et al., 2011; MANRIQUE-

POYATO et al., 2013). Em peixes este marcador também vem sendo aplicado com sucesso (GODWIN et al., 1997; LIU et al., 2006; PAZZA et al., 2007; LIU et al., 2009).

A metodologia de ISSR é um marcador rápido, barato e confiável e pode ser aplicado em estudos conservacionistas (JIN; LI, 2007, GARAYALDE et al., 2011, LIU et al., 2013, DOMINGOS et al., 2014, ZHENG et al., 2015). Em espécies que apresentam problemas de conservação, tal como o cavalo marinho *H. reidi*, os dados gerados pela utilização desta metodologia podem auxiliar no manejo adequado para a recuperação das populações com problemas de conservação.

CAPÍTULO 2

ARTIGO A SER ENVIADO PARA A REVISTA *AQUATIC CONSERVATION: MARINE AND FRESHWATER ECOSYSTEMS* (B1 EM BIODIVERSIDADE)

Diversidade genética de *Hippocampus reidi* (Ginsburg), uma espécie de cavalo-marinho em perigo de extinção

Maria Luiza Valões Cardoso¹, Carlos Henrique Campos Bezerra Neves², Martín Alejandro Montes², Ana Cristina Lauer Garcia¹ e Rosana Beatriz Silveira³

1- Centro Acadêmico de Vitória, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bairro Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

2- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Bairro Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

3- Laboratório de Aquicultura Marinha—LABAQUAC/Projeto Hippocampus. Rua da Esperança, s.n., 55590-000, Porto de Galinhas, Ipojuca, PE, Brasil.

Autor para correspondência: Ana Cristina Lauer Garcia. Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bairro Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. Fone +55813523-. Email: alauergarcia@yahoo.com.br

RESUMO

A interferência antrópica sobre o meio ambiente vem ocasionando prejuízos ambientais irreparáveis, tornando muitas espécies vulneráveis à extinção. Este é o caso de *Hippocampus reidi*, o cavalo-marinho de mais ampla distribuição geográfica no Brasil. Na região Nordeste do Brasil, no estuário do rio Maracaípe em Pernambuco, há anos considerado um “santuário” para esta espécie de peixe já não é possível encontrá-la em algumas amostragens. Entre as alternativas para recuperar populações em risco de extinção está à introdução de indivíduos vindos de outras populações demograficamente saudáveis. Outra opção seria a reprodução em cativeiro de indivíduos da própria população ameaçada e o posterior reforço da população com os descendentes. Neste trabalho discutimos qual o melhor plano de manejo em vista da diversidade genética de 30 adultos e 99 juvenis de *H. reidi* de Pernambuco e de 29 adultos de uma população próxima e demograficamente saudável proveniente do estado do Ceará. A metodologia de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) foi empregada com a utilização de quatro *primers*, para os quais todos os fragmentos amplificados foram polimórficos entre os grupos estudados. Os adultos e juvenis de Pernambuco apresentaram a menor diferenciação genética. O algoritmo de Neighbor-joining e o modelo de número de diferenças revelaram dois grupos, um com os adultos e juvenis de Pernambuco e outro com os adultos do Ceará. A análise de Evanno também apresentou um delta K maior para dois grupos, sendo a presença destes grupos confirmada pelo software Structure. A análise molecular da variância mostrou que mais de 30% das diferenças ocorrem entre esses dois grupos. Pelos riscos da depressão por exogamia e pelos resultados genéticos obtidos a melhor estratégia conservacionista para a população de Pernambuco seria a reprodução em cativeiro dos indivíduos desta população e o posterior reforço com os descendentes no ambiente natural.

Palavras chave: Brasil, ISSR, Maracaípe, Parque Nacional de Jericoacora, peixe.

INTRODUÇÃO

Os problemas de conservação geram dados alarmantes em todo o mundo. A perda de espécies ocorre em ritmo tão acelerado que se estima que estejamos próximos da sexta extinção em massa do planeta (Barnosky *et al.*, 2011). No ambiente marinho, onde muitas espécies desempenham um papel crucial em muitos processos biogeoquímicos que sustentam a biosfera, aproximadamente 1% dos organismos apresenta algum grau de perigo de extinção, no grupo dos peixes este número sobe para 4% (Vié *et al.*, 2009). A perturbação antrópica vem contribuindo para o aumento destes números, através da poluição e destruição dos habitats, assim como pela sobre exploração de várias espécies (Worm *et al.*, 2006).

Em relação aos cavalos-marinho, das mais de 50 espécies descritas, quase 25% estão listadas com algum grau de perigo de extinção (IUCN, 2015). Desde 2002 todas as espécies deste grupo foram adicionadas ao apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*). No Brasil ocorrem três espécies de cavalos-marinhos, *Hippocampus erectus*, *H. patagonicus* e *H. reidi* (Silveira *et al.*, 2014), todas classificadas como vulneráveis à extinção pelo Ministério do Meio Ambiente deste país (MMA, 2014). A degradação do ambiente natural e a pesca excessiva do cavalo-marinho ocorrem em muitos estados do Brasil, principalmente na região Nordeste do país. No estuário do rio Maracaípe, no estado de Pernambuco, antigamente conhecido como um “santuário” para *H. reidi*, há mais de 10 anos vem ocorrendo uma severa diminuição da população, chegando à zero em algumas amostragens monitoradas sistematicamente nesta localidade pelo “Projeto Hippocampus”, desde a sua fundação há mais de quinze anos (Silveira *et al.*, 2011).

Frente à tamanha perda de biodiversidade e os riscos que esta situação representa para o equilíbrio dos ecossistemas, a resposta a uma pergunta é vital: como preservar as diferentes espécies que se distribuem por nosso planeta? Entre as ferramentas que vem sendo utilizadas para assessorar essa resposta está à análise da diversidade genética. A perda significativa de variação genética pode limitar as chances de uma população responder favoravelmente às mudanças ambientais (Lande, 1988; Caro e Laurenson, 1994; Keller *et al.*, 1998; Brito e Fernández, 2000).

O conhecimento de como a diversidade genética de diferentes populações está estruturada é importante para guiar ações conservacionistas (Lande, 1988; Caro e Laurenson, 1994; Caughley, 1994). Dentro das alternativas viáveis para a recuperação de uma população, um caminho consiste na introdução de indivíduos de outra população

saudável sob o ponto de vista demográfico e genético (Edmands, 2007). Esta alternativa, no entanto, pode ter efeitos negativos como, por exemplo, a depressão por exogamia. Neste caso os híbridos interpopulacionais terão valores adaptativos mais baixos, ocasionados pelo rompimento de interações entre os genes e entre os genes e o ambiente, podendo haver quebra de genes coadaptados e a exposição de mutações que nunca tinham sido testadas juntas antes (Greig, 1979; Waser e Price, 1994; Whitlock *et al.*, 1995; Orr, 1996; Fenster *et al.*, 1997; Edmands, 1999; Gharrett *et al.*, 1999; Turelli *et al.*, 2001 Edmands e Deimler, 2004; Galloway e Etterson, 2005). As diferenças entre as populações que doarão e receberão os migrantes parece influenciar diretamente no resultado do manejo, assim quanto maior a divergência genética entre as populações maior será o efeito de exogamia (Edmands, 2002; Coyne e Orr, 2004; Mendelson *et al.*, 2004).

A recuperação de populações ameaçadas de extinção alternativamente pode ser realizada pela reprodução de indivíduos em cativeiro e o posterior manejo de reforço dos descendentes para a natureza (Williams e Hoffman, 2009). Por outro lado, esta forma de manejo também pode ser desfavorável. Em populações pequenas, os cruzamentos endogâmicos podem levar a expressão de alelos deletérios recessivos nos homozigotos. A sobredominância também explica a diminuição da adaptação nos casos de depressão por endogamia, sendo atribuída à superioridade de heterozigotos sobre ambos os homozigotos (Edmands, 2007).

No presente estudo investigamos a diversidade genética, pelo marcador de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), das populações de *H. reidi* do estuário do rio Maracaípe, no estado de Pernambuco e do Parque Nacional de Jericoacora, Ceará, visando avaliar qual a melhor estratégia de conservação para a recuperação da população de Pernambuco, a qual se encontra ameaçada de extinção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Amostras de cavalos-marinhos da espécie *H. reidi* foram coletadas em duas localidades na costa brasileira: no estuário do rio Maracaípe (8°32'14,9"S e 35°00'17,8"W, no estado de Pernambuco (n=30) e no Parque Nacional de Jericoacoara (2°50'23.82"S e 40°34'39.63"W), no estado do Ceará (n=29), Figura 1.

A proposta de se avaliar a população do Ceará como possível fonte de indivíduos para a população de Pernambuco fundamenta-se em dados de dinâmica populacional obtidos pelo Laboratório de Aquicultura Marinha, uma Instituição de direitos privados e sem fins lucrativos, responsável pelo desenvolvimento do “Projeto Hippocampus”, que se dedica a biologia, cultivo e conservação dos cavalos-marinhos. O projeto Hippocampus realiza estudos demográficos em diversas localidades ao longo da costa do Brasil e dados recentes, com amostragens entre 2011 e 2015, revelaram que a população de *H. reidi* do Ceará, além de ser uma das mais próximas de Maracaípe, encontra-se demograficamente estável e apresenta densidade maior de indivíduos em comparação com outras populações desta espécie (Silveira *et al.*, 2015), tal como as amostradas pelo Projeto nos estados do Piauí (Lopes *et al.*, 2015), Bahia (Almeida *et al.*, 2015) e Rio de Janeiro (Ferreira e Silveira, 2015; Vidon e Silveira, 2015). Outro ponto favorável para a escolha da análise genética da população do Ceará é que as correntes do Atlântico Sul favorecem a migração de indivíduos entre Pernambuco-Ceará (Peterson e Stramma, 1991; Tomczak e Godfrey 1994).

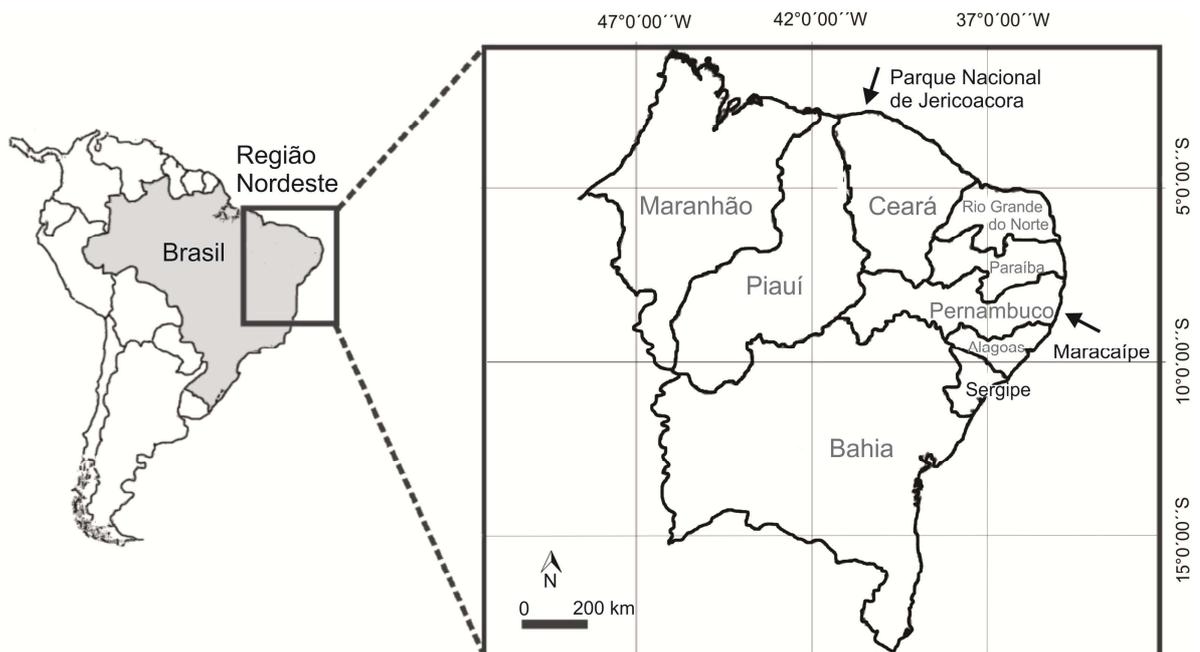


Figura 1. Mapa da América do Sul, com destaque para o Brasil e para a região Nordeste deste país. Esta região aparece ampliada e com a indicação (setas) dos pontos de amostragem dos cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus reidi*.

A captura das amostras dos cavalos-marinhos foi realizada manualmente, por mergulhos em apneia (ICMBio, Licença: 40311-2). De cada indivíduo coletado foi retirado um pequeno fragmento de tecido da nadadeira dorsal (tamanho de 1 x 2 mm), o qual foi estocado em etanol absoluto para a extração do DNA. A retirada da nadadeira dorsal não afeta as taxas de crescimento ou sobrevivência dos cavalos-marinhos (Lourie, 2003).

Foram analisados 99 juvenis de *H. reidi* provenientes de 10 casais do plantel de reprodutores de cavalos-marinhos oriundos de Maracaípe e mantidos pelo Projeto Hippocampus, neste caso os indivíduos inteiros foram utilizados para extração do DNA. Para a proposta do presente estudo analisamos em média 10 juvenis por aquário, que representam indivíduos da F1 e/ou da F2.

Extração e amplificação do DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada a partir da técnica de Medrano *et al.* (1990) com modificações. De uma amostra inicial de 24 *primers*, quatro foram selecionados para futuras análises: (CA)₆AT; (CA)₆GC; (CA)₆AG; (AGC)₄T. Estes *primers* foram selecionados pela produção de um alto número de bandas polimórficas, pela produção de bandas facilmente identificáveis e pela estabilidade apresentada na repetitividade da amplificação das bandas em um mesmo indivíduo. Devido ao fato de termos obtido DNA de um pequeno fragmento da nadadeira dorsal dos adultos nosso trabalho foi limitado à análise de quatro *primers* de ISSR.

O DNA nuclear foi amplificado por PCR usando os *primers* de ISSR selecionados. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20µl, contendo 20 ng do DNA molde, 0,25 µM de cada dNTPs, 200 nM de *primer*, 2,5 µl de tampão de PCR X10, 1 mM de MgCl₂, 1 unidade Taq DNA polimerase (Invitrogen kit®) e água destilada. Um controle negativo sem DNA foi utilizado em cada reação para verificar a ausência de contaminação.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos de extensão, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) e separados em gel de agarose a uma concentração de 2,5% em tampão TBE 1X corridos a 85V, 95mA e 95W constantes por uma hora. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por 100 bp DNA Ladder (Invitrogen ®). Um terço das amostras foi amplificado em duplicata para assegurar a

confiabilidade e a reprodutibilidade do padrão de bandas. Apenas as bandas que mostraram amplificação consistente foram consideradas. Bandas muito fracas e mal definidas foram excluídas das análises.

Análises dos dados

A partir das bandas dos géis de ISSR foram construídas tabelas binárias de presença e ausência. Os resultados desta matriz foram analisados com o programa FAMD, versão 1.3 (Schlüter e Harris, 2006) para estimar o número de loci polimórficos e a presença de bandas exclusivas.

A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada pelo programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), gerando matrizes de distância dentro e entre as populações amostradas. Foram construídos dendogramas, com o método de Neighbor-joining e o modelo de número de diferenças, utilizando o programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013). O mesmo método e modelo foram utilizados para calcular as distâncias genéticas dentro e entre as populações estudadas.

O programa Structure 2.3 foi usado para estimar o número mais provável de populações genéticas (K) (Pritchard *et al.*, 2000). O programa foi corrido com cinco cadeias independentes para cada valor de K de 1 a 10, com 10^6 replicações, sendo descartadas as primeiras 10^4 gerações. Os modelos de ausência de mistura e frequências alélicas independentes foram selecionados para esta análise. O número mais provável de populações foi estimado pelo teste de Evanno, de acordo com os valores do modelo (ΔK), com base na segunda ordem de taxa de mudança, em relação a K, com a função de verossimilhança (Evanno *et al.*, 2005).

Para verificar a presença de seleção neutral nas populações foi calculado o parâmetro Tajima D (Tajima, 1989), utilizando o programa DNAsp versão 5.1 (Rozas *et al.*, 2003). Este programa também foi utilizado para estimar a distribuição par a par das diferenças observadas e esperadas (distribuição *mismatch*).

RESULTADOS

Foram analisados 158 indivíduos de *Hippocampus reidi* constituídos por adultos e juvenis provenientes do estuário do rio Maracaípe, no estado de Pernambuco (30 e 99 indivíduos, respectivamente) e do Parque Nacional de Jericoacora (29 indivíduos adultos),

Tabela 1. Pelos dados concatenados dos quatro *primers* de ISSR utilizados foram identificadas 96 bandas, sendo todas polimórficas entre as populações estudadas.

Tabela 1. Populações de *Hippocampus reidi* estudadas, número de indivíduos (N) e número de bandas polimórficas para os quatro *primers* de ISSR investigados.

População	N	Bandas polimórficas
Adultos de Maracaípe, Pernambuco	30	91
Juvenis de Maracaípe, Pernambuco	99	94
Adultos do Parque Nacional de Jericoacora, Ceará	29	89

A distância genética dentro das populações, utilizando o número médio de diferenças, foi menor para os indivíduos do Ceará e maior e similar para os adultos e juvenis de Pernambuco. A população do Ceará apresentou valores elevados de distância genética em relação a Pernambuco. Para os adultos e juvenis de Pernambuco foram observados valores mais baixos de distância genética (Tabela 2).

A análise de similaridade pelo algoritmo de Neighbor-joining e o modelo do número de diferenças gerou uma árvore com dois grandes grupos, um deles formado pela mistura dos adultos e juvenis de Pernambuco e o outro pelos adultos de Ceará (Figura 2).

A análise de AMOVA mostrou forte estruturação populacional para a espécie estudada ($F_{st} = 0,301$), separando os adultos e juvenis de Pernambuco dos adultos de Ceará (Tabela 3). Esta mesma análise considerando três populações (Ceará, adultos de Pernambuco e juvenis de Pernambuco) apresentou baixa estruturação populacional ($F_{st} = 0,092$).

Tabela 2. Distância genética em *Hippocampus reidi* do litoral do Nordeste do Brasil medida com marcadores de ISSR. A distância genética foi calculada como a média do número de diferenças par a par. Nas células com fundo cinza está indicada a distância intrapopulacional e nas células com fundo branco a distância interpopulacional.

	Ceará (adultos)	Pernambuco (adultos)	Pernambuco (juvenis)
Ceará (adultos)	22,399		
Pernambuco (adultos)	41,975	34,602	
Pernambuco (Juvenis)	42,485	34,066	33,805

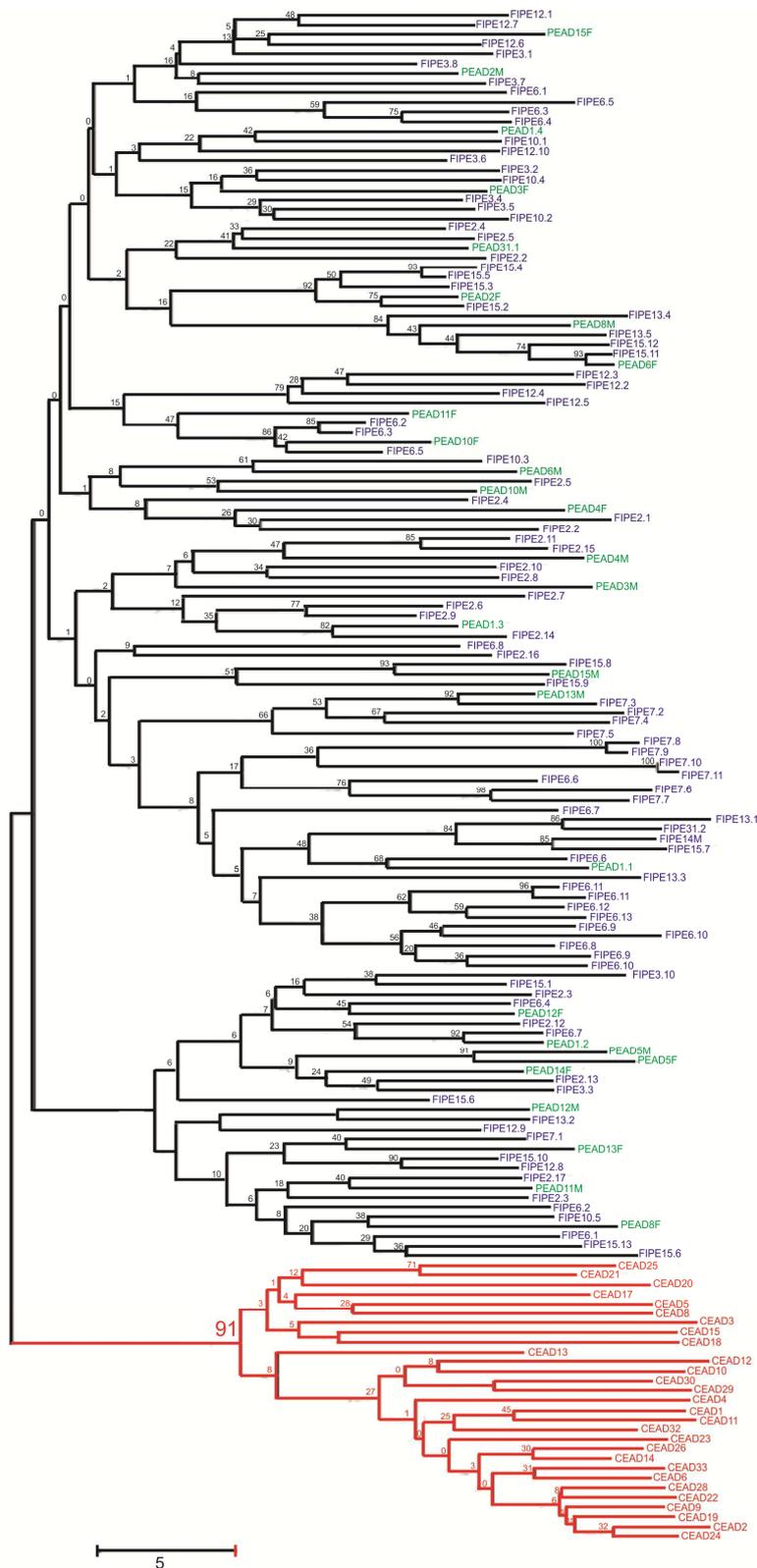


Figura 2. Árvore de Neighbor-Joining para *Hippocampus reidi* utilizando o modelo de número de diferenças. PEAD=Indivíduos adultos da população de Pernambuco (em verde), FIPE= Juvenis da população de Pernambuco (em azul), CEAD=Indivíduos adultos da população de Ceará (em vermelho).

Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) para 158 indivíduos de *Hippocampus reidi* pertencentes às populações de Pernambuco (adultos e juvenis) e de Ceará (adultos) usando quatro *primers* de ISSR. GL= graus de liberdade

Agrupamento	Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componente da variância	Porcentagem de variação
Dois grupos					
	Entre populações	1	341,922	6,88398	30,17
	Dentro das populações	157	2485,819	15,93474	69,83
Três grupos					
	Entre populações	2	355,361	3,79802	09,16
	Dentro das populações	156	2490,740	15,96628	90,84

O software STRUCTURE, que analisa a estrutura genética pela análise Bayesiana, revelou que o número de grupos genéticos (valor de K) que melhor se ajusta aos nossos dados, inferido através do teste de Evanno, foi K = 2 ($\Delta k = 166,003$), Figura 3. Já K=3 apresentou um valor baixo para o teste de Evanno ($\Delta K = 0,0911$). Esta análise confirmou a existência de uma população reunindo os juvenis e indivíduos adultos de Pernambuco e outra população com os indivíduos adultos de Ceará, mostrando a existência de dois grupos geneticamente diferenciados Figura 4.

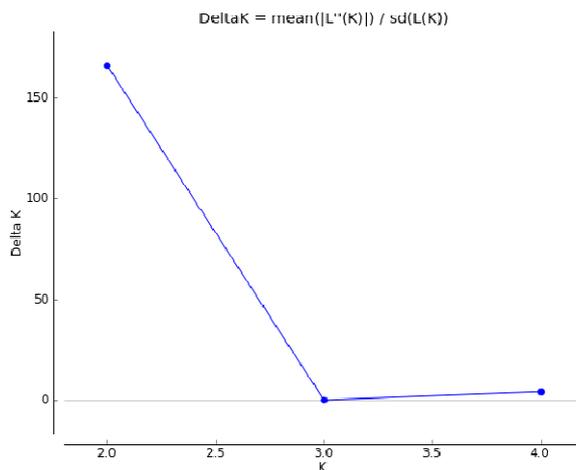


Figura 3. Gráfico dos valores de delta K para determinar o número ideal de grupos entre as amostras de *Hippocampus reidi* analisadas, constituídas por indivíduos adultos e juvenis de Pernambuco e indivíduos adultos de Ceará, usando quatro primers de ISSR e o método de Evanno no software STRUCTURE.

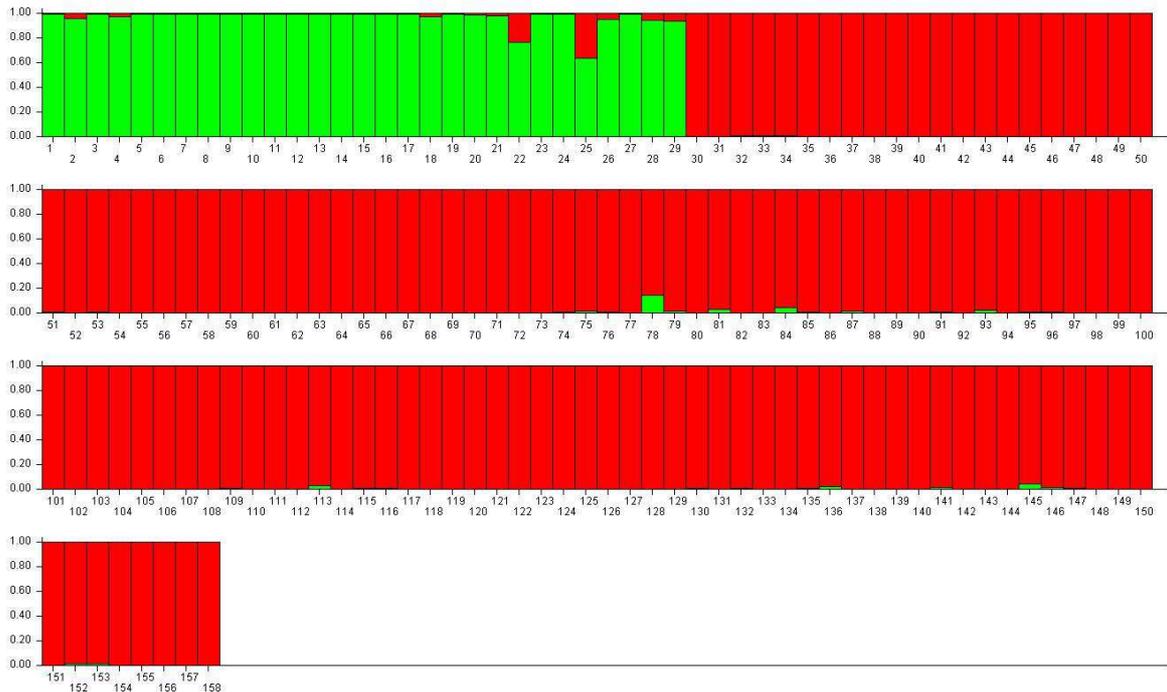


Figura 4. Análise de agrupamento Bayesiano de 158 amostras de *Hippocampus reidi* realizada com o software STRUCTURE para o modelo K=2. Cada barra vertical corresponde a um único indivíduo. O comprimento de cada cor é proporcional ao coeficiente de adesão estimado. De 1 a 29 - Indivíduos adultos de Ceará; de 30 a 59 - Indivíduos adultos de Pernambuco e de 60 a 158 – Juvenis da população de Pernambuco.

A análise de diferenças par a par (distribuição de *mismatch*) mostrou que não existe expansão populacional (Figura 5). O mesmo resultado foi observado no valor não significativo do teste de Tajima D (2.09679; $p=0.92700$).

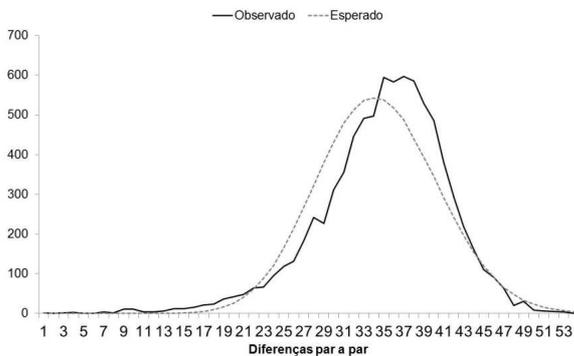


Figura 5. Distribuição de *mismatch* (par a par) observada e esperada para os indivíduos de *Hippocampus reidi* provenientes de Pernambuco (adultos e juvenis) e Ceará (adultos) de acordo com o modelo de crescimento populacional.

DISCUSSÃO

A perda de variabilidade genética pode diminuir ou limitar a capacidade adaptativa de uma população frente aos desafios ambientais. De forma especial e mais imediata, isto ocorre em populações demograficamente pequenas (Frankham *et al.*, 2010). Ao contrário desta expectativa, para os cavalos-marinhos de Pernambuco a queda populacional não parece estar acompanhada de erosão genética. A diversidade genética das duas localidades investigadas foi quantitativamente similar, sendo este um indicativo do possível sucesso de recuperação da população de Pernambuco após o manejo adequado. Observamos que os cavalos-marinhos adultos de Pernambuco apresentaram diferenças genéticas em relação aos de Ceará, sendo estruturados em duas populações.

Por que não utilizar a população de Ceará como fonte de novos indivíduos para Pernambuco? Esta decisão é fundamentada na possível ocorrência de um fenômeno conhecido como “depressão por exogamia”, o qual é justificado pela diferenciação genética existente entre duas localidades. Este fenômeno ocasiona a redução da adaptação dos híbridos interpopulacionais, devido ao rompimento de interações favoráveis entre os genes e o ambiente (Templeton, 1986), a exposição de mutações que nunca tinham sido testadas juntas antes (Schierup e Christiansen, 1996) ou por quebras de interações epistáticas pela recombinação (Waser, 1993). Estes eventos podem aparecer na primeira geração ou nas gerações subsequentes (Dobzhansky, 1948; Templeton, 1986).

Os efeitos da depressão por exogamia já foram mencionados em diversos grupos de organismos. Em anfíbios, cruzamentos entre populações separadas por pouco mais de 100 km levaram a produção de indivíduos menores e com malformações (Sagvik *et al.*, 2005). Em insetos, como mosquitos, moscas e besouros, diversas más formações, baixa taxa de eclosão e sobrevivência dos descendentes, foram atribuídas aos efeitos da exogamia em populações afastadas desde poucos quilômetros até mais 1.000 km (Armbruster *et al.*, 1999; Aspi 2000, Peer e Taborsky, 2005). No grupo das aves e dos peixes, há registros de diminuição na taxa de sobrevivência e aumento da assimetria bilateral como consequência da exogamia (Gharrett e Smoker 1991; Gharrett *et al.*, 1999; Marr *et al.*, 2002). Em todos os casos citados a depressão por exogamia foi obtida por cruzamentos de indivíduos entre populações afastadas por distâncias menores, ou até mesmo, semelhantes as que separam as populações de *H. reidi* de Ceará e Pernambuco (em torno de 1.100 km), evidenciando o possível risco de cruzarmos indivíduos destas duas populações.

Alguns autores evidenciaram que o efeito da exogamia é proporcionalmente maior quanto mais elevada forem as diferenças genéticas entre os indivíduos das populações

hibridadas (Burton 1990a,b; Edmands *et al.*, 1999, Escobar *et al.*, 2008). Ellison e Burton (2008) demonstraram que a depressão por exogamia deve-se a incompatibilidade dos genomas nucleares e mitocondriais dos híbridos, ocasionada pela recombinação do genoma nuclear na meiose. O nível de diferença genética que observamos para as populações de Ceará e Pernambuco é compatível com as encontradas pelos estudos aqui citados, sendo mais uma evidência do potencial de depressão por exogamia que a população de Pernambuco poderia experimentar se indivíduos da população do Ceará fossem transportados para lá.

Os juvenis de Pernambuco foram geneticamente semelhantes aos adultos desta localidade, formando um único grupo. Este resultado favorece a opção da reprodução de indivíduos de Pernambuco em cativeiro e a utilização dos descendentes para reforçar esta população no ambiente natural.

Um ponto muito importante na reprodução em cativeiro é que não ocorra perda de diversidade genética no processo de reforço da população. Igualmente importante é evitar a diferenciação genética da população em cativeiro e da natural pelo efeito da deriva e da seleção artificial ao cativeiro (Ebenhard, 1995; Williams e Hoffman 2009). Em nossos resultados observamos que para a população de Pernambuco os juvenis apresentam diversidade genética qualitativa e quantitativamente semelhante aos adultos, o que demonstra que não houve mudança ou perda de diversidade genética desta população na formação do plantel para reprodução.

Entre os primeiros casos de organismos que foram reproduzidos em cativeiro e reintroduzidos com êxito na natureza estão a ave *Gallirallus owstoni* (Derrickson e Snyder, 1992) e o mamífero *Mustela nigripes* (Miller *et al.*, 1996). Os programas de reprodução em cativeiro que visam à preservação da flora e da fauna são denominados de “reprodução para a conservação” (Ebenhard 1995). Bloxam e Tonge (1994) salientam que dentre todas as espécies do planeta, aquelas com alta taxa de fecundidade e curto tempo de geração, como é o caso de *H. reidi* (Silveira e Fontoura, 2010), são as mais adequadas aos programas de reprodução em cativeiro.

No final dos anos de 1980 e início dos anos de 1990 os estudos mostravam que, sob o ponto de vista genético, as populações dos programas de reprodução em cativeiro eram menos diversas em comparação com as populações selvagens (Allard, 1988; Verspoorl, 1988; Briscoe *et al.*, 1992). Entre as causas para esta menor diversidade Briscoe *et al.* (1992) apontaram o excessivo número de gerações em que população em cativeiro eram mantidas. Esta constatação foi corroborada por vários estudos, nos quais foi observado que muitas vezes populações mantidas em cativeiro apresentavam perda de variabilidade

genética a cada geração. Esta situação devia-se primeiramente a endogamia e, finalmente, a falta de planejamento dos cruzamentos. Muitos programas de reprodução não cruzavam indivíduos que representavam geneticamente a população natural e não controlavam a progênie para evitar a deriva genética (Koljonen *et al.*, 2002; Charpentier *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007). A solução para os problemas anteriores seria manter no cativeiro por poucas gerações, a fim de evitar a perda de diversidade genética (Kraaijeveld-Smit *et al.*, 2006). Como os juvenis utilizados na análise deste estudo representam a descendência de cruzamentos de indivíduos de Pernambuco capturados na natureza, ou a descendência dos juvenis destes cruzamentos, não observamos perda de diversidade genética, já que os mesmos são resultantes de uma ou duas gerações.

Na reprodução para conservação após o êxito de procriar em cativeiro sem perder variabilidade genética, um dos caminhos é o processo de reforço, chamado de revigoramento populacional. Este processo consiste na liberação intencional de indivíduos da mesma espécie em uma população existente, visando melhorar a viabilidade da população, apresentando menores riscos que a reintrodução. No reforço deve ser tomado o cuidado de manter ou aumentar a diversidade genética da população que recebe os indivíduos (IUCN/SSC, 2013). Na revisão de Fischer e Lindenmayer (2000) os autores observaram que quase 27% dos casos de deslocamentos de animais em risco de extinção foram para reforço. Mais de 70% deste total foram reforços com indivíduos da mesma população reproduzidos em cativeiro. A reprodução em cativeiro com finalidades de reforço de populações com algum grau de risco de vulnerabilidade demográfica pode ser uma solução viável para evitar a extinção (Hedrick e Fredrickson, 2008).

Várias espécies de peixes passaram por programas de reprodução em cativeiro e reforço, visando recuperar as populações originais (Doyle *et al.*, 2001; Sekino *et al.*, 2004; Eldridge e Killebrew 2008). Este processo também vem sendo utilizado com sucesso para outros grupos de organismos (Bennett *et al.*, 2013; Ferrer *et al.*, 2013; Qingwen *et al.*, 2013; Péchy *et al.*, 2015). Estas informações, juntamente com o êxito em reproduzir *H. reidi* em cativeiro, mantendo a variabilidade genética da população natural de Pernambuco na progênie, nos levam a sugerir que o reforço, atrelado à reprodução em cativeiro, é uma alternativa viável para a recuperação desta população de cavalos-marinhos. Para este procedimento devem ser utilizados progenitores nativos e descendência com poucas gerações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PETROBRÁS, CAPES e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio financeiro para a execução desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Allard RW. 1988. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. *Journal of Heredity* **79**: 225-238.
- Almeida GMCO, Silva JRS, Santos ACA, Silveira RB. 2015. Estudo da biologia do cavalo-marinho, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) no estuário do rio Jaguaripe, manguezal de cacha pregos, ilha de Itaparica, Bahia. 1º Simpósio Brasileiro da fauna Sobre-explotada e ameaçada de extinção (Simbrafauna), 1º Workshop Syngnathidae Brasil. Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil.
- Armbruster P, Bradshaw WE, Steiner AL, Holzapfel CM. 1999. Evolutionary responses to environmental stress by the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Heredity* **83**: 509-519.
- Aspi J. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in male courtship song characters in *Drosophila montana*. *Heredity* **84**: 273-282.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA. 2011. Has the earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* **471**: 51–57.
- Bennett SE, Vásquez JJ, Sánchez L, Sinarahua LL, Murayari A, Martínez A, Peláez AL, Millán J. 2013. Preliminary observations from a welfare release of woolly monkeys in the Colombian Amazon, In *Global Re-introduction Perspectives: 2013. Further case-studies from around the globe*, Soorae PS (ed.). IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi: Gland, Switzerland; 229-234.
- Bloxam QMC, Tonge SJ. 1994. Amphibians: suitable candidates for breeding-release programmes. *Biodiversity and Conservation* **4**: 636-644.
- Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Barker JSF. 1992. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: Implications for genetic management of captive populations. *Conservation Biology* **6**: 416-42.
- Brito D, Fernandez FAS. 2000. Dealing with extinction is forever: Understanding the risks faced by small populations. *Ciência e Cultura* **52**: 161-170.

- Burton RS. 1990a. Hybrid breakdown in developmental time in the copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution* **44**: 1806–1813.
- Burton RS. 1990b. Hybrid breakdown in physiological response: a mechanistic approach. *Evolution* **44**: 1814–1822.
- Caro RM, Laurenson MK. 1994. Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* **263**: 485–486.
- Caughley G. 1994. Directions in conservation biology. *Journal Animal Ecology* **63**: 215–244.
- Charpentier M, Setchell JM, Prugnolle F, Knapp LA, Wickings EJ, Peignot P, Hossaert-McKey M. 2005. Genetic diversity and reproductive success in mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16723-16728.
- Coyne JA, Orr HA. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Derrickson SR, Snyder NFR. 1992. Potentials and limits of captive breeding in parrot conservation. In *New world parrots in crisis: solutions from conservation Biology*, Beissinger SR, Snyder NFR (eds.). Smithsonian Institution Press: Washington, USA; 133–163.
- Dobzhansky T. 1948. Genetics of natural populations: XVIII. Experiments on chromosomes of *Drosophila pseudoobscura* from different geographic regions. *Genetics* **33**: 588–602.
- Doyle RW, Perez-Enriquez R, Takagi M, Taniguchi N. 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica* **111**: 291–304.
- Ebenhard T. 1995. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 438–443.
- Edmands S, Deimler JK. 2004. Local adaptation, intrinsic coadaptation and the effects of environmental stress on interpopulation hybrids in the copepod *Tigriopus californicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **303**: 183–196.
- Edmands S. 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution* **53**: 1757–1768.
- Edmands S. 2002. Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 520–527.
- Edmands S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**: 463–475

- Eldridge WH, Killebrew K. 2008. Genetic diversity over multiple generations of supplementation: an example from Chinook salmon using microsatellite and demographic data. *Conservation Genetics* **9**: 13-28.
- Ellison CK, Burton RS. 2008. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* **62**: 631–638.
- Escobar JS, Nicot A, David P. 2008. The Different sources of variation in inbreeding depression, heterosis and outbreeding depression in a Metapopulation of *Physa acuta*. *Genetics* **180**:1593–1608.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. 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.
- Fenster CB, Galloway LG, Chao L. 1997. Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* **12**: 282–286.
- Ferreira CB, Silveira RB. 2015. Densidade populacional de cavalos-marinhos na praia da Engenhoca, Baía de Guanabara, RJ. 1º Simpósio Brasileiro da fauna Sobre-explotada e ameaçada de extinção (Simbrafauna), 1ºWorkshop Syngnathidae Brasil. Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil.
- Ferrer P, Laguna E, Ferrando I, Hurtado A, Albert F, Navarro A, Escribá MC, Piera M, Martínez F, Arregui JM, Juárez J, Navarro L. 2013. First steps for the conservation translocation of the betic alder buckthorn in Eastern Spain. In *Global Re-introduction Perspectives: 2013. Further case-studies from around the globe*, Soorae PS (ed.). IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi: Gland, Switzerland; 257-262.
- Fischer J, Lindenmayer DB. 2000. An assessment of the published results of animal relocations. *Biological Conservation* **96**:1-11.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge.
- Galloway LF, Etterson JR. 2005. Population differentiation and hybrid success in *Campanula americana*: geography and genome size. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 81–89.
- Gharrett AJ, Smoker WW, Reisenbichler RR, Taylor SG. 1999. Outbreeding depression in hybrids between odd and even broodyear salmon. *Aquaculture* **173**: 117–129.

- Gharrett AJ, Smoker WW. 1991 Two generations of hybrids between even- and odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*: A Test for Outbreeding Depression? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**: 1744-1749.
- Greig JC. 1979. Principles of genetic conservation in relation to wildlife management in Southern Africa. *South African Journal of Wildlife Research* **9**: 57–78.
- Hedrick PW, Fredrickson RJ. 2008. Captive breeding and reintroduction of Mexican and red wolves. *Molecular Ecology* **17**: 344-350.
- [IUCN] International Union for Conservation of Nature. 2015. <http://www.iucnredlist.org/> [10 de december 2015].
- [IUCN/SSC] International Union for Conservation of Nature/ Species Survival Commission. 2013. *Guidelines for reintroductions and other conservation translocations*. IUCN Species Survival Commission: Gland, Switzerland.
- Keller LF. 1998. Inbreeding and its fitness effects in an insular population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution* **52**: 240–250.
- Koljonen ML, Tähtinen J, Säisä M, Koskiniemi J. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* **212**: 69–93.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Griffiths RA, Moore RD, Beebee TJC. 2006. Captive breeding and the fitness of reintroduced species: a test of the responses to predators in a threatened amphibian. *Journal of Applied Ecology* **43**: 360–365.
- Lande R, 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**: 1455–1460.
- Lopes SB, Silva JRS, Silveira RB. 2015. Dinâmica populacional de *Hippocampus reidi* no estuário do rio Camurupim-Cardoso, Apa delta do Parnaíba, PI. 1º Simpósio Brasileiro da fauna Sobre-explotada e ameaçada de extinção (Simbrafauna), 1ºWorkshop Syngnathidae Brasil. Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil.
- Lourie SA. 2003. Fin-clipping procedure for seahorses. In *Project Seahorse Technical Bulletin 3 Fisheries Centre*, Martin-Smith K (ed.). University of British Columbia: London; 1-4.
- Marr AB, Keller LF, Arcese P. 2002. Heterosis and outbreeding depression in descendants of natural immigrants to an inbred population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution* **56**:131-142.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* **8**: 43.

- Mendelson TC, Inouye BD, Rausher MD. 2004. Quantitative patterns in the evolution of reproductive isolation. *Evolution* **58**: 1424–1433.
- Miller B, Reading RP, Forrest S. 1996. *Prairie night: black-footed ferrets and the recovery of endangered species*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA.
- [MMA] Ministério do Meio Ambiente. 2014. Portaria Nº445, de 17 dezembro de 2014. Pag, 128. Diário oficial da união - Seção 1, ISSN 1677-7042. Brazil.
- Orr HA. 1996. Dobzhansky, Bateson, and the genetics of speciation. *Genetics* **144**: 1331-1335.
- Péchy, Halpern B, Sós E, Walzer. 2015. Conservation of the Hungarian meadow viper *Vipera ursinii rakosiensis*. *International Zoo Yearbook* 49: 89–103.
- Peer K, Taborsky M. 2005. Outbreeding depression, but no inbreeding depression in haplodiploid ambrosia beetles with regular sibling mating. *Evolution* **59**: 317–323.
- Peterson RG, Stramma L. 1991. Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. *Progress in Oceanography* **26**, 1-73.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Qingwen LZ, Xiangying W, Wenchao Z. 2013. Re-introduction of *Manglietia longipedunculata*, an endemic and critically endangered species in China. In *Global Re-introduction Perspectives: 2013. Further case-studies from around the globe*, Soorae PS (ed.). IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi: Gland, Switzerland; 241-245.
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.
- Sagvik J, Uller T, Olsson M. 2005. Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* **6**: 205–211.
- Schierup MH, Christiansen FB. 1996. Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity* **77**: 461–468.
- Schlüter PM, Harris SA. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* **6**: 569-572.
- Sekino M, Sugaya T, Hara M. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **233**: 163-172.
- Silveira RB, Ferreira SF, Silva JRS. 2015. Densidade populacional de *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) no “passeio do cavalo-marinho” em Mangue Seco, Parque Nacional de Jericoacora, CE. 1º Simpósio Brasileiro da fauna Sobre-explotada e ameaçada de

- extinção (Simbrafauna), 1ºWorkshop Syngnathidae Brasil. Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil.
- Silveira RB, Fontoura NF. 2010. Fecundity and fertility of the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae), in tropical Brazil. *Revista Brasileira de Biociências* **8**: 362-367.
- Silveira RB, Ramineli SM, Veja MK, Rosa RA, Azevedo MG. 2011. Turismo x conservação: estudo de caso do passeio do cavalo-marinho no estuário do Rio Maracaípe (Ipojuca, PE): hora de remediar a situação. *Revista Brasileira de Ecoturismo* **4**: 566.
- Silveira RB, Siccha-Ramirez R, Silva JR, Oliveira C. 2014. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Zootaxa* **3861**: 317-332.
- Silveira RB. 2005. Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. PhD thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Templeton AR. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*, Soulé ME (ed.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts: USA; 105–116.
- Tomczak M, Godfrey JS. 1994. *Regional Oceanography: An Introduction*. Elsevier, Oxford.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 490–496.
- Verspoor E. 1988. Reduced genetic variability in first-generation hatchery populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**:1686-1690.
- Verspoorl E. 1988. Reduced Genetic Variability in First-Generation Hatchery populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **45**:1686-1690.
- Vidon LF, Silveira RB. 2015. Variação na densidade populacional dos cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) na praia do Abraãozinho, Baía da Ilha Grande, RJ. 1º Simpósio Brasileiro da fauna Sobre-explotada e ameaçada de extinção (Simbrafauna), 1ºWorkshop Syngnathidae Brasil. Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil.

- Vié JC, Hilton-Taylor C, Stuart SN. 2009. *Wildlife in a Changing World – An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland, Switzerland.
- Waser NM, Price MV. 1994. Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: seed set and offspring fitness. *Evolution* **43**: 1097–1109.
- Waser NM. 1993. Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In *The Natural History of inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*, Thornhill NW (ed.). University of Chicago Press: USA; 173-199.
- Whitlock MC, Phillips PC, Moore FBG, Tonsor S. 1995. Multiple fitness peaks and epistasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**: 601–629.
- Williams SE, Hoffman EA. 2009. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: a review. *Biological Conservation* **142**: 2388–2400.
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, Jackson JBC, Lotze HK, Micheli F, Palumbi SR, Sala E, Selkoe KA, Stachowicz JJ, Watson R. 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* **314**: 787-790.
- Xu YC, Fang SG, Li ZK. 2007. Sustainability of the South China tiger: implications of inbreeding depression and introgression. *Conservation Genetics* **8**:1199–1207.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente estudo, pelos dados de diversidade genética, concluímos que a reprodução em cativeiro é melhor estratégia para recuperar a população de *H. reidi* do estuário do rio Maracaípe em Pernambuco. Na proposta inicial desta pesquisa tínhamos em mente uma segunda alternativa de manejo que seria a introdução em Maracaípe de indivíduos provenientes do Parque Nacional de Jericoacora, no Ceará, onde há uma filial do “Projeto Hippocampus” (uma das mais próximas de Maracaípe) e dados apontando para o estado demográfico saudável desta população (SILVEIRA et al., 2015). No entanto, esta alternativa foi descartada, já que Pernambuco e Ceará se mostraram como duas populações distintas, e afastadas sob o ponto de vista genético.

Para que a estratégia de conservação da população de Maracaípe se torne possível deve-se salientar os esforços empregados pelo “Projeto Hippocampus”, que monitora a população dos cavalos-marinhos de Maracaípe há 15 anos. Atualmente, o Projeto Hippocampus pesquisa em nove estados brasileiros, nestes locais são realizados estudos que visam contribuir para a elaboração de planos de manejo adequados para cada região.

A equipe do “Projeto Hippocampus” desenvolve trabalhos nas áreas de taxonomia (SILVEIRA et al., 2014), ocorrência e dinâmica populacional (SILVEIRA, 2011; FERREIRA; SILVEIRA, 2015; LOPES et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015; VIDON; SILVEIRA, 2015), genética (NEVES et al., 2015), morfologia e histologia (SILVEIRA, 2000a,b; SILVEIRA; FOUNTOURA, 2010), parasitologia (SILVEIRA, 2005), comportamento e cultivo em cativeiro de cavalos-marinhos (SILVEIRA, 2000c; SILVEIRA, 2001; SILVEIRA; MACEDO, 2005; SILVEIRA, 2009; SILVEIRA; FOUNTOURA, 2010; SILVEIRA et al., 2010). Esta visão “multidisciplinar” do projeto é fundamental na luta pela sobrevivência dos cavalos-marinhos.

Os resultados obtidos no presente estudo, por si só, não garantem a recuperação da população de Maracaípe. Desta forma, após a decisão de que a melhor estratégia para recuperar esta população é a reprodução em cativeiro, pesquisas complementares as aqui realizadas se tornam fundamentais para decidir, por exemplo, a melhor idade para a liberação dos descendentes na natureza, a escolha sobre a melhor época do ano para esta ação, as condições ideais de cultivo em laboratório, assim como para o monitoramento populacional após o manejo. Diversos estudos estão sendo conduzidos dentro desta perspectiva, como a análise dos parâmetros populacionais de diferentes espécies de *Hippocampus*, incluindo estudos sobre o pico da estação reprodutiva, aspectos relacionados à fertilidade/fecundidade e a idade/altura de formação da bolsa incubadora do macho, idade/altura da primeira maturação sexual entre outros (SILVEIRA, 2001; SILVEIRA, 2005;

SILVEIRA, 2009; SILVEIRA; FONTOURA, 2010), os quais dão subsídios para a conservação da espécie. Outro fator importante é a técnica de cultivo do cavalo-marinho em cativeiro, que já é dominada pela equipe do “Projeto Hippocampus” (SILVEIRA et al., 2010), a alimentação dos genitores e da prole é feita com presas vivas para que, caso retornem ao ambiente natural, não encontrem dificuldades em caçar. Na própria sede do projeto são desenvolvidos os cultivos de microalgas, rotíferos, copépodos, artemias, camarões e peixes, utilizados para a manutenção dos aquários de cavalos-marinhos.

Outra importante linha do “Projeto Hippocampus” é o apelo social pela conservação do cavalo-marinho. Com o lema "Algumas pessoas acham ele lindo, outras acham estranho. Nós achamos que ele tem que continuar existindo", o projeto mantém um centro de visitação para escolas, universidades, comunidades locais e turistas, recebendo em média de 3500 visitantes por mês (<http://www.projetohippocampus.org/site/>).

Sabemos que os cavalos-marinhos estão desaparecendo da costa brasileira, principalmente por questões de interferência antrópica, como a poluição dos ambientes naturais, a pesca incidental, o manuseio inadequado, entre outros fatores (SILVEIRA, 2005). Em vista desta grave situação, quanto mais a população humana se conscientizar desta realidade maior serão as chances de salvamos os cavalos-marinhos e muitas outras espécies que, por consequência, correm o risco de desaparecer com estes peixes tão carismáticos. Em vista do grau de ameaça que se encontram as espécies de cavalos-marinhos que habitam a costa brasileira, os estudos voltados a sua conservação devem seguir várias áreas do conhecimento e de forma intensa. Vale destacar aqui que o monitoramento constante do estuário do rio Maracaípe, desde o estabelecimento do “Projeto Hippocampus” em Porto de Galinhas, serviu de alerta para o fato de que este “santuário” de cavalos-marinhos estava desaparecendo. Este fato foi o propulsor da presente pesquisa, mostrando a importância dos estudos de base para que se conheçam as espécies em perigo de extinção e, posteriormente se busquem formas de conservá-las.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. T. et al. The complete mitochondrial genome sequence of the world's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*), and its comparison with those of related shark species. **Gene**, v. 539, n. 1, p. 44-49, 2014.

ANTUNES, R. S. P. et al. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 674-684, 2010.

AVISE, J. C. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. **Conservation Biology**, p. 686-690, 1995.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Harvard university press, 2000.

BERGERT, A.; WAINWRIGHT, P. C. Morphology and kinematics of prey capture in the syngnathid fishes *Hippocampus erectus* and *Syngnathus floridae*. **Marine Biology**, v. 127, n. 4, p. 563-570, 1997.

BOEHM, J. T. et al. Marine dispersal and barriers drive Atlantic seahorse diversification. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 10, p. 1839-1849, 2013.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant molecular biology reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.

CANO, J. et al. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. **Journal of dermatological science**, v. 39, n. 1, p. 17-21, 2005.

CONSI, T. R. et al. The dorsal fin engine of the seahorse (*Hippocampus* sp.). **Journal of morphology**, v. 248, n. 1, p. 80-97, 2001.

DAŞTAN, S. D.; BARDAKCI, F.; DEGERLI, N. Genetic Diversity of *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, n. 3, 2012.

DIAS, T. L.; ROSA, I. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus erectus* Perry, 1810 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 65, n. 3, p. 326-326, 2002.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 28, n. 1, p. 137-167, 2003.

DOMINGOS, T. J. et al. Genetic and morphological diversity of *Moenkhausia oligolepis* (Characiformes: Characidae) populations in the tributaries of the Araguaia River, Brazil: implications for taxonomy and conservation. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 13, n. 3, p. 7979, 2014.

DURNA, S.; BARDAKCI, F.; DEGERLI, N. Genetic diversity of *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 1, p. 83-92, 2010.

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. como base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, v. 13, p. 79-86, 2001.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-molecular aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa 2007.

FEDRIZZI, N. et al. Population Genetic Structure of the Dwarf Seahorse (*Hippocampus zosterae*) in Florida. **PloS one**, v. 10, n. 7, 2015.

FELÍCIO, A. K. C. et al. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. **Journal of ethology**, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2006.

FERREIRA, C. B.; SILVEIRA, R. B. Densidade populacional de cavalos-marinhos na praia da Engenhoca, Baía de Guanabara, RJ. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FAUNA SOBRE-EXPLOTADA E AMEAÇADA DE EXTINÇÃO (SIMBRAFAUNA), 1., 2015; WORKSHOP SYNGNATHIDAE BRASIL, 1., 2015. **Anais...** Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil: Hippocampus, 2015.

FILLEUL, M. A. **Optimizing growth of juvenile big bellied seahorse *Hippocampus abdominalis* Lesson.** 97 p. 1996. Tese (Bachelor of Science Applied) - Bachelor of Science Applied, University of Tasmania, Launceston, 1996.

FLYNN, A. J.; RITZ, D. A. Effect of habitat complexity and predatory style on the capture success of fish feeding on aggregated prey. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 79, n. 03, p. 487-494, 1999.

FOSTER, S. J.; VINCENT, A. C. J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **Journal of fish biology**, v. 65, n. 1, p. 1-61, 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

FRITZSCHE, R. A. Revision of the eastern Pacific Syngnathidae (Pisces, Syngnathiformes), including both recent and fossil forms. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 42, n. 6, p. 181-227, 1980.

FROESCHKE, G.; SOMMER, S. Insights into the complex associations between MHC class II DRB polymorphism and multiple gastrointestinal parasite infestations in the striped mouse. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. 31820, 2012.

FROESE, R.; PAULY, D. **Fishbase.** 2015. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: 20 nov. 2015.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. D. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. _____ (eds.). **Fundação SOS Mata Atlântica, Conservação Internacional**. Belo Horizonte: Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, 2005.

GARAYALDE, A. F. et al. Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. **Annals of Applied Biology**, v. 158, n. 3, p. 305-317, 2011.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v. 18, n. 9, p. 1524-1528, 1997.

GOFFREDO, S.; PICCINETTI, C.; ZACCANTI, F. Volunteers in marine conservation monitoring: a study of the distribution of seahorses carried out in collaboration with recreational scuba divers. **Conservation Biology**, v. 18, n. 6, p. 1492-1503, 2004.

GONZÁLEZ, R. et al. Genetic evidence and new morphometric data as essential tools to identify the Patagonian seahorse *Hippocampus patagonicus* (Pisces, Syngnathidae). **Journal of fish biology**, v. 84, n. 2, p. 459-474, 2014.

GOSWAMI, M. et al. Genetic heterogeneity in the Indian stocks of seahorse (*Hippocampus kuda* and *Hippocampus trimaculatus*) inferred from mtDNA cytochrome b gene. **Hydrobiologia**, v. 621, n. 1, p. 213-221, 2009.

HAN, Z. et al. The genetic divergence and genetic structure of two closely related fish species *Lateolabrax maculatus* and *Lateolabrax japonicus* in the Northwestern Pacific inferred from AFLP markers. **Genes & Genomics**, v. 37, n. 5, p. 471-477, 2015.

HALE, M. E. Functional morphology of ventral tail bending and prehensile abilities of the seahorse, *Hippocampus kuda*. **Journal of morphology**, v. 227, n. 1, p. 51-65, 1996.

HATANAKA, T.; GALETTI, J. R. P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.

HENRIKSSON, O. et al. Genetic identification and population structure of juvenile Mullet (Mugilidae) collected for aquaculture in East Africa. **Western Indian Ocean journal of marine science**, v. 11, n. 1, p. 41-54, 2012

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Ass. Inc. Publishers, 1996.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). **Red list of threatened species**. 2015. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 02 dez. 2015.

JAMES, P. L.; HECK, K. L. J. The effects of habitat complexity and light intensity on ambush predation within a simulated seagrass habitat. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 176, n. 2, p. 187-200, 1994.

JIN, ZEXIN.; LI, JUNMIN. Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Forest ecology and management**, v. 245, n. 1, p. 130-136, 2007.

KENDRICK, A. J.; HYNDES, G. A. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v. 72, n. 4, p. 415-427, 2005.

KLEIBER, D. et al. The importance of seahorses and pipefishes in the diet of marine animals. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 21, n. 2, p. 205-223, 2011.

KUITER, R. H. K. Revision of the Australian seahorses of the genus *Hippocampus* (Syngnathiformes: Syngnathidae) with descriptions of nine new species. **Records-Australian Museum**, v. 53, n. 3, p. 293-340, 2001.

KUITER, R. H. K. **Seahorses and their relatives**. Aquatic photographs, 2009.

KUITER, R. H. **Seahorses, pipefishes and their relatives: a comprehensive guide to Syngnathiformes**. Chorleywood, U.K: TMC Publishing; Twayne Publishers, 2000.

LACERDA, D. R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LIU, Y. G. et al. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 565-572, 2006.

LIU, J. et al. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14860-14871, 2013.

LIU, Y. G. et al. Population genetics studies of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 11, p. 821-827, 2009.

LOPES, S. B.; SILVA, J. R. S.; SILVEIRA, R. B. Dinâmica populacional de *Hippocampus reidi* no estuário do rio Camurupim-Cardoso, Apa delta do Parnaíba, PI. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FAUNA SOBRE-EXPLOTADA E AMEAÇADA DE EXTINÇÃO (SIMBRAFAUNA), 1., 2015; WORKSHOP SYNGNATHIDAE BRASIL, 1., 2015. **Anais...** Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil: Hippocampus, 2015.

LOURIE, S. A. et al. **A Guide to the Identification of Seahorses**. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004.

LOURIE, S. A.; RANDAL, J. E. A. New Pygmy Seahorse, *Hippocampus denise* (Teleostei Syngnathidae) from the Indo-Pacific. **Zoological Studies**, v. 42, n. 2, p. 284-291, 2003.

LOURIE, S. A.; VINCENT, A. C.; HALL, H. J. **Seahorses**: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse London: Institute for the Oceans and Fisheries, 1999. 214 p.

LOURIE, S. A. et al. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (family Syngnathidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, n. 2, p. 231-256, 1999.

LU, Z. et al. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. **Plant Science**, v. 170, n. 2, p. 407-412, 2006.

MAI, A. C. G.; ROSA, I. L. Aspectos ecológicos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no estuário Camurupim/Cardoso, Piauí, Brasil, fornecendo subsídios para a criação de uma Área de Proteção Integral. **Biota Neotrop**, v. 9, n. 3, p. 85-91, 2009.

MANRIQUE-POYATO, M. I. et al. Population genetic structure of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the south and east of the Iberian Peninsula. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. 59041, 2013.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. D. C. Biologia molecular e evolução. In: _____. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos/Sociedade Brasileira de Genética, 2012. p. 256.

MATTEVI, M. S. Caracterização Genético-molecular da Biodiversidade. In: MARQUES EK. **Diagnóstico Genético-molecular**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. p. 259-282

MICHELLE, T. **The locomotory and myotomal musculature of the seahorse *Hippocampus abdominalis***. 201 f. 1993. Tese (Mestrado) – University of Canterbury, 1993.

BRASIL. Ministerio do Meio Ambiente. Portaria N°445, de 17 dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 128, 2014.

MOBLEY, K. B.; SMALL, C. M.; JONES, A. G. The genetics and genomics of Syngnathidae: pipefishes, seahorses and seadragons. **Journal of Fish Biology**, v. 78, n. 6, p. 1624-1646, 2011.

MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: COLD SPRING HARBOR SYMPOSIUM OF QUANTITATIVE BIOLOGY, 1986. v. 51, p. 263-273.

MUSOLF, K.; MEYER-LUCHT, Y.; SOMMER, S. Evolution of MHC-DRB Iclass II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). **Immunogenetics**, v. 56, n. 6, p. 420-426, 2004.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and applied genetics**, v. 94, n. 5, p. 597-602, 1997.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3. ed. New York, USA: John Wiley and Sons, 1994. 624 p.

NEVES, C. H. C. B. et al. Genética da conservação de populações de *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) no litoral do nordeste do Brasil. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FAUNA SOBRE-EXPLOTADA E AMEAÇADA DE EXTINÇÃO (SIMBRAFAUNA), 1., 2015; WORKSHOP SYNGNATHIDAE BRASIL, 1., 2015. **Anais...** Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil: Hippocampus, 2015.

NORMAN, J. R.; GREENWOOD, P. H. **A History of Fishes**. 3. ed. London: E. Benn Ltd, 1975.

OUBORG, N. J. et al. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in genetics**, v. 26, n. 4, p. 177-187, 2010.

PAIVA, S. D.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 370-375, 2005.

PAZZA, R. et al. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 843-851, 2007.

PIACENTINO, G. L. M. ÁREA DE DISTRIBUCIÓN PARA EL GÉNERO *Hippocampus* E *H. patagonicus* Piacentino & Luzzatto 2004 Y NUEVA CITA PARA *Hippocampus reidi* Guinsburg 1933 (PISCES, SYNGNATHIFORMES) EN EL MAR ARGENTINO. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 21, n. 1, 2008.

PIACENTINO, G. L.; LUZZATTO, D. C. *Hippocampus patagonicus* sp. nov., nuevo caballito de mar para la Argentina (Pisces, Syngnathiformes). **Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat**, v. 6, p. 339-349, 2004.

PORTER, M. M. et al. Highly deformable bones: unusual deformation mechanisms of seahorse armor. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 6, p. 6763-6770, 2013.

ROSA, I. L. et al. Fisheries and trade of seahorses in Brazil: historical perspective, current trends, and future directions. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 9, p. 1951-1971, 2011.

ROSA, I. L. et al. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 405-414, 2007.

ROSA, I. L.; DIAS, T. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 64, n. 4, p. 378-378, 2002.

SANTOS, L. F. et al. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical genetics**, v. 49, n. 7-8, p. 540-554, 2011.

SCHAD, J. et al. Evidence for the 'Good Genes' model: association of MHC class II DRB alleles with ectoparasitism and reproductive state in the neotropical lesser bulldog bat, *Noctilio albiventris*. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. 37101-37101, 2012.

SCHAD, J. et al. MHC class II DRB diversity, selection pattern and population structure in a neotropical bat species, *Noctilio albiventris*. **Heredity**, v. 107, n. 2, p. 115-126, 2011.

SILVEIRA, R. B. Alguns aspectos da reprodução e desenvolvimento de cavalos-marinhos. In: GARCIA, JACKEL.; GARCIA. (Org.). **Embriologia**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2001

SILVEIRA, R. B. Comportamento reprodutivo e desenvolvimento inicial de *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 em laboratório. **Biociências**, v. 8, n. 1, p. 115-122, 2000.

SILVEIRA, R. B. Desenvolvimento osteológico de *Hippocampus reidi* Ginsburg (Pisces, Syngnathidae) em laboratório. I. Período Embrionário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 2, p. 505-513, 2000a.

SILVEIRA, R. B. Desenvolvimento osteológico de *Hippocampus reidi* Ginsburg (Pisces, Syngnathidae) em laboratório. II. Período Juvenil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 2, p. 515-531, 2000b.

SILVEIRA, R. B. **Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil**. 129 f. 2005. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Porto Alegre, 2005.

SILVEIRA, R. B. Influência dos óleos e graxas sobre o comportamento e crescimento inicial de *Hippocampus reidi* (Pisces, Syngnathidae) em laboratório. **Atlântica**, v. 22, p. 141-147, 2000c.

SILVEIRA, R. B. Registros de cavalos-marinhos (syngnathidae: *hippocampus*) ao longo da costa brasileira. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 316-325, 2011.

SILVEIRA, R. B. Sobre o comportamento sexual do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Pisces: Syngnathidae) em laboratório. **Biociências**, v. 17, p. 20-32, 2009.

SILVEIRA, R. B.; FERREIRA, S. F.; SILVA, J. R. S. Densidade populacional de *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) no “passeio do cavalo-marinho” em Mangue Seco, Parque Nacional de Jericoacora, CE. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FAUNA SOBRE-EXPLOTADA E AMEAÇADA DE EXTINÇÃO (SIMBRAFAUNA), 1., 2015; WORKSHOP SYNGNATHIDAE BRASIL, 1., 2015. **Anais...** Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil: Hippocampus, 2015.

SILVEIRA, R. B.; FONTOURA, N. F. Fecundity and fertility of the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae), in tropical Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 362-367, 2010.

SILVEIRA, R. B.; MACEDO, M. E. P. Dieta aplicada à rotina de laboratório do Projeto *Hippocampus* e consequente formação de prole em *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Teleostei: Syngnathidae). In.: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, XVI., 2005. **Anais...** João Pessoa, Brasil: 2005.

SILVEIRA, R. B.; SANTOS, L. P. S.; SIQUEIRA, A. J. Fechamento do ciclo de vida do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em laboratório. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, XXXVIII., 2005. **Anais...** Belém, Brasil: 2010.

SILVEIRA, R. B. et al. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. **Zootaxa**, v. 3861, n. 4, p. 317-332, 2014.

SILVEIRA, R. B. et al. Turismo x Conservação: Cavalos-marinhos do Estuário do Rio Maracaípe (Ipojuca, PE): Hora de Remediar a Situação. In.: CONGRESSO NACIONAL DE ECOTURISMO. 8.; ENCONTRO INTERDISCIPLINAR DE ECOTURISMO EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. 4. 2011. São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Ipá Ti-uá de Meio Ambiente Cultura e Sociedade, 2011, p. 566. Disponível em: <http://www.ipatiua.com.br/viii_conecotur_iv_ecouc/site/documentos/Anais%20do%20VIII%20CONECOTUR%20S%20Paulo%202011.pdf>. Acesso em: 12 Agos. 2015.

STOLTING, K. N.; WILSON, A. B. Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model. **BioEssays**, v. 29, n. 9, p. 884-896, 2007.

TESKE, P. R.; BEHEREGARAY, L. B. Evolution of seahorses' upright posture was linked to Oligocene expansion of seagrass habitats. **Biology Letters**, v. 5, p. 521–523, 2009.

TSUMARA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.

UEDA, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 506-511, 2003.

VARI, R. P. The seahorses (subfamily Hippocampinae). Fishes of the Western North Atlantic. **Memoir**, v. 1, n. 8, p. 173-189, 1982.

VIDON, L. F.; SILVEIRA, R. B. Variação na densidade populacional dos cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) na praia do Abraãozinho, Baía da Ilha Grande, RJ. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FAUNA SOBRE-EXPLOTADA E AMEAÇADA DE EXTINÇÃO (SIMBRAFAUNA), 1., 2015; WORKSHOP SYNGNATHIDAE BRASIL, 1., 2015. **Anais...** Porto de Galinhas, Ipojuca, Brasil: Hippocampus, 2015.

VINCENT, A. C. J. **Reproductive ecology of seahorses**. 1990. Tese (Doutorado) - University of Cambridge, Cambridge, 1990.

VINCENT, A. C. J. Seahorses exhibit conventional sex roles in mating competition, despite male pregnancy. **Behaviour**, v. 128, n. 1, p. 135-151, 1994.

VINCENT, A. C. J. **The international trade in seahorses**. Cambridge, UK: Traffic International, 1996.

WAN, Q. H. et al. Which genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**, v. 25, n. 14, p. 2165-2176, 2004.

WANG, X. et al. Complete mitochondrial genome sequence of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933; Gasterosteiformes: Syngnathidae). **Mitochondrial DNA**, p. 1-2, 2014.

WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 438-450, 1998.

WASKO, A. P.; GALETTI, J. R. P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, v. 474, n. 1-3, p. 131-137, 2002.

WILLADINO, L. et al. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360, p. 10-16, 2012.

WOODAL, L. C. et al. First occurrence of the lined seahorse *Hippocampus erectus* in the eastern Atlantic Ocean. **Journal of fish biology**, v. 75, n. 6, p. 1505-1512, 2009.

WOODAL, L. C.; KOLDEWEY, H. J.; SHAW, P. W. Historical and contemporary population genetic connectivity of the European short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* and implications for management. **Journal of fish biology**, v. 78, n. 6, p. 1738-1756, 2011.

ZHANG, X. P.; LI, X. H.; QIU, Y. X. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. **Biochemical systematics and ecology**, v. 34, n. 1, p. 38-47, 2006.

ZHANG, H. et al. The complete mitochondrial genome sequence of the network pipefish (*Corythoichthys flavofasciatus*) and the analyses of phylogenetic relationships within the Syngnathidae species. **Marine genomics**, v. 19, p. 59-64, 2015.

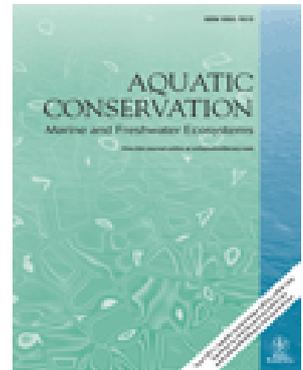
ZHENG, W. H. et al. Conservation and population genetic diversity of *Curcuma wenyujin* (Zingiberaceae), a multifunctional medicinal herb. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 3, p. 10422, 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

ANEXO

Normas para publicação no periódico:

Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems



Edited By: Professor Philip J. Boon and Professor John M. Baxter

Impact Factor: 2.136

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 18/83 (Water Resources); 26/103 (Marine & Freshwater Biology); 90/223 (Environmental Sciences)

Online ISSN: 1099-0755

Author Guidelines

Please note that effective with the 2011 volume, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* has been published in an online-only format. For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Permission Request Form](#)

Author Guidelines

Relevance

You should consult the Journal's '[Aims and Scope](#)' to ensure that your paper falls within one or more of the areas published by *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **Whatever the topic, it is important that your paper explains the relevance and application of your work to the conservation and management of aquatic habitats and species.**

Manuscript submission

Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click [ScholarOne](#) to navigate to the *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* online submission site. IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the last year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system

File Types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls. **LaTeX** files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided **in addition** to the source files. Figures may be provided in .tiff or .eps format.

Initial Submission

NON-LATEX USERS: Upload your manuscript files. At this stage, further source files do not need to be uploaded.

LATEX USERS: For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

Submission of a Revised Manuscript

NON-LATEX USERS: Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LATEX USERS: When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your now revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded manuscripts must be deleted. If your

manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Copyright and Permissions

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [Wiley Author Services](#) and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author, unless specifically requested.

Manuscript Style

The language of the journal is English (spelling -- Oxford English Dictionary). All submissions must have a title and have a margin of 3 cm all round. Illustrations and tables must be on separate sheets, and not be incorporated into the text.

Manuscripts should not be written in the first person (i.e. sentences involving words such as 'we', 'us', 'our') as our journal uses third-person sentence construction: 'Samples were taken at 15 sites...' rather than 'We took samples from 15 sites...'. In *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* we reserve the use of first-person sentence construction for places where authors are voicing their opinion: e.g. 'We consider that further research is required in this area'.

The **title page** must list the full names and affiliations of all authors. The postal and email addresses, as well as the telephone and fax numbers, should only be given for the author who will check the proofs and answer any correspondence.

- The name(s) of any sponsor(s) of the research contained in the paper, along with the grant number(s) should be included in the Acknowledgements.
- Supply an **abstract** of up to 300 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work and consist of a series of short, numbered statements.
- Include 6-10 keywords underneath the Abstract, using the standard keyword list and the protocol for keyword selection given in ScholarOne.

- Divide your article into sections entitled Introduction, Methods, Results and Discussion and Acknowledgements unless the nature of the paper justifies an alternative format.

As well as full length papers, the journal also publishes short communications and brief contributions.

Short Communications

Papers in this section provide authors with an opportunity to publish preliminary results of new research, or more descriptive studies where detailed data are expected later. Articles will normally cover no more than six printed pages, including an Abstract, all tables, figures, and references.

Commentary and Correspondence

Papers in this section will include brief contributions on topical issues, comments on papers published in *Aquatic Conservation*, and outline descriptions of new research projects. All articles must be no longer than 1000 words, contain no abstract, figures, tables, and sub-headings, and a maximum of four references. Articles will be published at the discretion of the Chief Editors who may request revision before acceptance, but will not be subject to peer review.

Publication of biodiversity data

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu).

Pre-Submission English Language Editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can

also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Reference Style

References should be quoted in the text as name and year within brackets and listed at the end of the paper alphabetically. Where reference is made to more than one work by the same author published in the same year, identify each citation in the text as follows: (Collins, 1998a, b). Where three or more authors are listed in the reference list, please cite in the text as (Collins *et al.*, 1998). Where references are cited in the texts in groups, they should be listed in date order and not alphabetically (e.g. Harris, 1997; Thomas, 2004; Bennett, 2008).

For references published online but not yet in print give the DOI where possible.

In the reference list, papers with more than 10 authors should only have the first 10 named followed by '*et al.*', unless there are 11 authors when all should be named.

When accepted for publication:

Smith J. In press. Title of paper. *Name of Journal*.

For Journal articles:

Rivadeneira MM, Santoro CM, Marquet PA. 2010. Reconstructing the history of human impacts on coastal biodiversity in Chile: constraints and opportunities. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystems* **20**: 74-82.

Journal Titles should be full.

For books:

Naiman RJ. 1994. *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates: Sunderland, MA.

For articles in edited volumes (e.g. books, special issues, conference proceedings):

Meyer JL, Wallace JB, 2001. Lost linkages and lotic ecology: rediscovering small streams. In *Ecology: Achievement and Challenge*, Press MC, Huntly NJ, Levin S (eds). Blackwell Scientific: Oxford; 295-317.

For reports:

Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates, and fish. US Environmental Protection Agency Office of Water, Washington, DC.

For theses

Jerling HL. 1994. Feeding ecology of mesozooplankton in the Sundays River Estuary. PhD thesis, University of Port Elizabeth, South Africa.

For European directives:

Council of the European Communities, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23rd October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* **L327**: 1-72.

For software packages:

SAS. 2002. JMP version 5 statistics and graphics guide. SAS, Cary, NC.+

For references from the World Wide Web

Scottish Natural Heritage. 2000. <http://www.snh.org.uk/> [14 June 2000]

Illustrations

Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

Tables should be part of the main document and should be placed after the references. If the table is created in excel the file should be uploaded separately.

Colour Illustrations

All figures in colour are published free of charge.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional: tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related

nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the Acknowledgements, headed 'Supporting Information'. Short legends should be included here, listing the titles of all supporting figures, tables, data etc. Full (more detailed) legends for Supporting Information must also be uploaded as a separate Word document. This version will be used online, alongside where the Supporting Information is hosted, but not in the manuscript text, which instead uses the short versions of the legends. For image files (i.e. TIFF, JPEG etc.), legends should not be embedded. Instead, when uploading the image file to ScholarOne, please use the space provided to paste in the legend so that it appears underneath the figure in the PDF that is sent to the reviewers. In order to protect reviewer anonymity, material posted on authors' websites cannot be reviewed.

Supporting Information items should be referred to in the text as follows:

Supporting figures: Figure S1, Figure S2 etc.

Supporting tables: Table S1, Table S2 etc.

Supporting data: Data S1, Data S2 etc.

Supporting experimental procedures: Methods S1, Methods S2 etc.

Supporting animations: Movie S1, Movie S2 etc.

Any other text-based Supporting Information: Appendix S1, Appendix S2 etc.

The above order should be used when listing the Supporting Information legends, both in the short versions in the main manuscript text file, as well as in the separate full legends file.

Post Acceptance

Further Information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the submitting author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you

would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Authors Resources: Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for [authors](#) and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tools

Cite EarlyView Articles

To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following example:

DOI 10.1002/hep.20941, becomes <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20941>