

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
Rachycentron canadum, POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

LAIS FERREIRA NOVAES

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
ABRIL – 2015**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
Rachycentron canadum, POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

LAIS FERREIRA NOVAES

Engenheira de Pesca

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Campus de Ciências Agrárias
Ambientais e Biológicas, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Soraia Barreto Aguiar Fonteles

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

ABRIL – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

N935e	<p data-bbox="608 1375 821 1402">Novaes, Lais Ferreira.</p> <p data-bbox="608 1406 1177 1514">Estrutura genética de populações da espécie <i>Rachycentron canadum</i>, por meio de marcadores ISSR / Lais Ferreira Novaes._ Cruz das Almas, BA, 2015. 69f.; il.</p> <p data-bbox="646 1547 1102 1599">Orientadora: Norma Suely Evangelista Barreto. Coorientadora: Soraia Barreto Aguiar Fonteles.</p> <p data-bbox="608 1630 1177 1709">Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p data-bbox="608 1740 1177 1848">1.Bijupirá (Peixe) – Genética. 2.Bijupirá – Diversidade biológica. 3.Marcadores genéticos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p data-bbox="922 1879 1090 1906">CDD: 597.49135</p>
-------	--

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LAIS
FERREIRA NOVAES



Prof^ª. Dr^ª. Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)



Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

ABRIL – 2015

À minha mãe, Dinamar Ferreira, por ser o meu alicerce e seguir junto a mim na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha caminhada foram muitos aqueles que contribuíram na conquista dos meus objetivos e me ajudaram a superar os obstáculos que surgiram. Portanto, é com muito orgulho que agradeço a realização deste trabalho em forma de sonho.

Aos meus pais, em especial a minha mãe, Dinamar Ferreira, meus olhos quando não posso ver, meus ouvidos quando é difícil ouvir, meu exemplo de ser humano honroso e íntegro, que está sempre ao meu lado, nos momentos difíceis e acima de tudo nas minhas conquistas.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Curso de Pós-Graduação Ciência Animal por conceder a oportunidade de estudar e aprimorar minha qualificação científica-profissional.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro cedido.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Norma Suely Evangelista-Barreto pelas lições ao longo do meu percurso na formação acadêmica e disponibilidade em me orientar e a minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Soraia Barreto Aguiar Fonteles, por sempre ter acreditado no meu potencial ao me estimular na realização dos nossos trabalhos.

Aos familiares próximos pelo apoio sempre que possível.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes.

Aos colegas do Laboratório de Ictiogenética pelo auxílio na realização do meu trabalho, incentivo na rotina diária e pelos bons momentos de descontração.

Ao MSc. José Luiz Sanches Júnior e a instituição Bahia Pesca pelo apoio ao ceder os peixes como parte das coletas realizadas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira pela cooperação nas análises realizadas no trabalho e aos pesquisadores Dr. Rodrigo Augusto Torres e MSc. Emilly Anny Benevides de Abreu pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Lurdes Foresti de Almeida Toledo do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por abrir as portas do seu laboratório para a realização das análises moleculares.

O meu muito obrigada!

LISTA DE SIGLAS

AMOVA – *Analyses of Molecular Variance* – Análise de Variância Molecular

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico

EST – *Expressed Sequence Tags* – Etiquetas de Sequência Expressa

FAO – *Food And Agriculture Organization of the United Nations* – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat* – Sequências Simples Entre Repetições

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase

SSR – *Simple Sequence Repeat* – Sequências Simples Repetidas

RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>F</i>	Índice de fixação
<i>F_{ST}</i>	Divergência genética entre populações
<i>G_{ST}</i>	Diferenciação genética entre populações
<i>H</i>	Diversidade de Nei
<i>ha</i>	Hectare
<i>Kg</i>	Quilogramas
<i>I</i>	Índice de Shannon
<i>mM</i>	Milimolar
<i>N_m</i>	Fluxo gênico
<i>pb</i>	Pares de base
<i>ppm</i>	Partes por milhão
<i>μL</i>	Microlitro
<i>μm</i>	Micromolar
<i>U</i>	Unidade
<i>σ</i>	Desvio padrão

LISTA DE FIGURAS

Página

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *Rachycentron canadum*, POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Figura 1. Exemplar de *Rachycentron canadum*, em coleta realizada no cultivo da Bahia Pesca, localizada no município de Ituberá – Bahia..... 4

Figura 2. Distribuição geográfica mundial da espécie *Rachycentron canadum* indicando sua presença nos locais sombreados.....5

CAPÍTULO I

MARCADORES ISSR NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *Rachycentron canadum*..... 27

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose utilizando o *primer* ISSR 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações naturais do Piauí (numerados de 1 a 20), Ceará (numerados de 1 a 20) e Rio Grande do Norte (numerados de 1 a 16). M = Marcador *Ladder* 100pb. As setas indicam a presença do fragmento com 1200 pb..... 36

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose utilizando o *primer* ISSR 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações naturais do Rio Grande do Norte (17 e 18), Paraíba (numerados de 1 a 14), Bahia (numerados de 1 a 20) e populações cativas de Pernambuco (numerados de 1 a 13) e Rio de Janeiro (numerados de 1 a 5). M = Marcador *Ladder* 100pb. A seta indica a presença do fragmento 1200 pb..... 36

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose utilizando o *primer* 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações cativas do Rio de Janeiro (numerados de 6 a 13), São Paulo (numerados de 1 a 20) e Bahia Pesca (numerados de 1 a 16). M = Marcador *Ladder* 100 pb. As setas indicam a ausência do fragmento com 1200 pb..... 37

Figura 4. Dendrograma formado pelo método UPGMA (Método de ligação média entre grupos) com as populações naturais de *Rachycentron canadum* da costa brasileira com base na distância genética de Nei (Nei, 1972) 40

Figura 5. Dendrograma formado pelo método UPGMA (Método de ligação média entre grupos) com as populações cultivadas de *Rachycentron canadum* no Brasil com base na distância genética de Nei (Nei, 1972) 42

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

MARCADORES ISSR NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *Rachycentron canadum*..... 27

Tabela 1. Indivíduos da espécie *Rachycentron canadum* coletados em diferentes estados brasileiros..... 32

Tabela 2. *Primers* utilizados para a amplificação de DNA da espécie *Rachycentron canadum*..... 33

Tabela 3. *Primers* ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre as diferentes populações da espécie *Rachycentron canadum* e suas características moleculares..... 35

Tabela 4. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira..... 38

Tabela 5. Diversidade genética das populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira..... 39

Tabela 6. Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) para as populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira..... 39

Tabela 7. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil..... 41

Tabela 8. Diversidade genética das populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil..... 41

Tabela 9. Estimativa da diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) para as populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil..... 42

Tabela 10. Análise de variância molecular dentro e entre populações da espécie *Rachycentron canadum* do Brasil..... 43

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO..... 1

2 OBJETIVOS..... 3

3 REVISÃO DE LITERATURA..... 4

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 20

Capítulo 1

MARCADORES ISSR NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA
ESPÉCIE *Rachycentron canadum*..... 27

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 58

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *Rachycentron canadum*, POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Autora: Lais Ferreira Novaes

Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto

RESUMO

Rachycentron canadum, conhecido como bijupirá, é um peixe marinho com ampla distribuição geográfica e que tem despertado o interesse do setor aquícola, bem como o seu conhecimento biológico. O estudo genético em torno da estrutura de populações é um alicerce relevante tanto para a implantação de políticas sustentáveis para a exploração dos recursos genéticos, quanto o melhoramento de estoques de peixes na piscicultura. Este trabalho teve como objetivo verificar a variação genética entre indivíduos de populações naturais do bijupirá encontrados na costa litorânea do Brasil e aqueles de populações cultivadas, por meio de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram obtidas amostras de 155 indivíduos e utilizados 9 *primers*, que geraram 144 *loci* polimórficos. O número de alelos observados, diversidade genética esperada de Nei e índice de Shannon variaram de 1,58, 0,1865 e 0,2855 para as populações nativas e 1,39, 0,1378 e 0,2054 para as populações cativas, respectivamente. O coeficiente de diferenciação (G_{ST}) revelou o valor de 0,1751 e fluxo gênico (N_m) de 2,35 para as populações selvagens, enquanto as populações cultivadas tiveram $G_{ST}=0,2966$ e $N_m=1,1858$. Os resultados da AMOVA mostraram que a diversidade genética populacional foi mais elevada dentro das populações (61,54%) do que entre as populações (38,46%). A partir do índice F_{ST} é possível classificar a estruturação populacional de *R.canadum* variando de moderada (0,19) a alta (0,38). Por meio dos resultados obtidos observou-se que há maior diferenciação genética nas populações naturais quando comparadas às populações cultivadas, o que sugere aprimorar o monitoramento e manejo da espécie nos cultivos para que estas não percam o seu potencial genético ao longo do tempo.

Palavras-chave: aquíicultura; bijupirá; marcador molecular; populações naturais.

THE GENETIC STRUCTURE OF THE *Rachycentron canadum* SPECIES POPULATION USING ISSR MARKER

Autora: Lais Ferreira Novaes

Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto

ABSTRACT

The species *Rachycentron canadum*, known as cobia, is a marine fish widely distributed and currently has increased the interest of the aquaculture sector and the biological knowledge of the species. The fish population's genetic structure study is an important foundation for the implementation of sustainable policies for the exploitation of genetic resources and the improvement of fish stocks in fish farming. This study aimed to characterize the genetic diversity between samples of cobia's natural populations found in the Brazilian coasts and captive populations of different cultures through ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular marker. There were used 155 samples and 9 primers, from which 144 polymorphic *loci*. The number of observed alleles, expected genetic diversity of Nei and Shannon index ranged from 1,58, 0,1865 and 0,2855 for the native populations and 1,39, 0,1378 and 0,2054 for captive populations, respectively. The coefficient of gene differentiation (G_{ST}) revealed the number of 0,1751 and the gene flow (N_m) of 2,3555 in wild populations, while $G_{ST}=0,2966$ and $N_m=1,1858$ in captive populations. The AMOVA results showed that the genetic diversity in the global population study was higher within populations (61.54%) than among populations (38.46%). From the F_{ST} index was possible to classify the populational structure of *R. canadum* with moderate variation (0,19) and high structure (0,38). Through the results obtained, it was observed that there is more genetic variation in natural populations when compared to cultivated populations, suggesting the monitoring and management of the species in crops needs improvement to not lose their genetic potential over time.

Keywords: aquaculture; cobia; molecular marker; wild populations.

1 INTRODUÇÃO

Diante da crescente demanda por alimentos a atividade aquícola tem se desenvolvido vigorosamente e conquistado destaque no cenário da pecuária nacional, considerando-se a sua consolidação já existente no mercado mundial da produção de peixes advindo da aquicultura. Este setor possui um potencial e ritmo de crescimento que ultrapassa as mesmas possibilidades quando comparado às outras atividades agropecuárias (FAO, 2010). Um dos fatores que contribuem para essa realidade é a deficiência que os recursos pesqueiros atualmente apresentam diante da sua capacidade de exploração por não conseguirem suprir a necessidade de consumo esperada. Com isso, a aquicultura marinha surge como uma alternativa sustentável na obtenção de proteína animal.

Dentre as inúmeras espécies de peixes aptas para serem domesticadas e bem sucedidas na sua posterior produção e comercialização encontra-se o *R. canadum*, conhecido popularmente no Brasil como bijupirá e que apresenta características essenciais que a torna propícia para o cultivo, tal como boa qualidade da carne, taxa de crescimento rápido e elevada resistência a doenças (SUN; CHEN, 2014). Apesar de ser uma espécie de peixe nativa, presente em toda a costa brasileira, seu cultivo ainda está em fase de desenvolvimento e busca apoio por meio de investimentos políticos, interesses privados e projetos experimentais para tornar a aquicultura marinha fonte efetiva de renda e obtenção de lucro para pequenos e grandes produtores. Por outro lado, o conhecimento biológico dos animais selecionados deve preceder o recrutamento de indivíduos nativos para a formação do plantel de reprodutores e até mesmo a formação de todo o estoque de uma piscicultura, de modo que corresponda às expectativas provenientes da espécie para a sua produção. Phinchongsakuldit *et al.* (2013) afirmaram que para o desenvolvimento da aquicultura e formulação de políticas relacionadas a gestão e conservação da

pesca é necessário o conhecimento genético de populações selvagens, bem como informações sobre a diversidade genética dessas populações como componentes essenciais para o início de qualquer programa de melhoramento genético no desenvolvimento de estoques domesticados para a aquicultura.

Sob a perspectiva do conhecimento em torno do genoma (toda constituição genética de um organismo), total ou parcial, a utilização de marcadores moleculares tem sido aplicada em larga escala nos mais diversos tipos de estudos que envolvem a produção e aprimoramento de recursos genéticos explorados pelo homem. O incremento de ferramentas para a análise de DNA que tem ocorrido nas últimas décadas possibilitou a crescente capacidade de determinar a variação genética dentro e entre as populações, no qual a caracterização tradicional, que era restringida por meio de atributos fenotípicos, pode agora ser complementada pelo aumento do número disponível de marcadores moleculares e o desenvolvimento de programas estatísticos para a sua análise (TORO *et al.*, 2009).

O marcador do tipo *Inter Simple Sequence Repeat*, que atua em conjunto com a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, é aplicado nos estudos em questão, pois são eficientes na produção de sequências polimórficas. De acordo com Lv *et al.* (2012), o marcador apresenta algumas vantagens em relação aos outros, como: os *primers* anelam diretamente nas repetições e as sequências alvo são abundantes ao longo do genoma eucarioto, que evoluem rapidamente; conseqüentemente os ISSRs podem revelar um número muito maior de fragmentos polimórficos. A busca de informações sobre *R. canadum* se torna válida diante do possível acesso direto ao DNA genômico que possibilita observar características de diferenciação populacional da espécie, pois segundo Nguyen *et al.* (2009), o uso de reprodutores sem conhecimento genético prévio leva à uma segunda geração restringida de diversidade genética. Contudo, preservar a variabilidade contida nos recursos genéticos animais é uma etapa fundamental para a permanente viabilidade das espécies a médio e longo prazo (HILSDORF; ORFÃO, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparação genético-populacional entre e dentro das populações naturais e cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* coletadas em diferentes estados e cultivos no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Formação de um banco genético *in-vitro* de tecido da espécie *R. canadum*.
- Verificar a eficiência na aplicação do marcador molecular ISSR em estudos genéticos para a espécie *R. canadum*.
- Inferir na estruturação genética das populações nativas da espécie *R. canadum* presente no litoral brasileiro.
- Inferir a variabilidade genética das populações cativas da espécie *R. canadum* presente em cultivos no Brasil.
- Comparar a diferenciação genética existente entre as populações cativas e nativas da espécie *R. canadum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie - *Rachycentron canadum*

Os Perciformes caracterizam-se por ser a mais diversa ordem de peixes e a maior do grupo dos vertebrados. Entre os peixes que a compõe está a espécie *Rachycentron canadum* (Figura 1), única representante da família Rachycentridae. No Brasil a espécie é conhecida popularmente como bijupirá, beijupirá e pirambijú (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980).

Figura 1. Exemplar de *Rachycentron canadum*, em coleta realizada no cultivo da Bahia Pesca, localizada no município de Ituberá – Bahia.

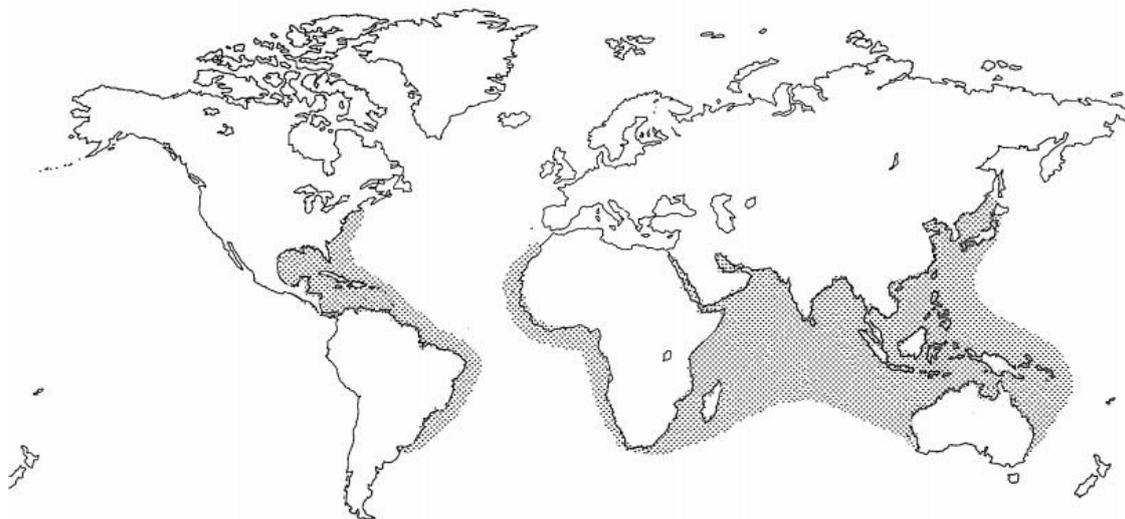
Fonte: arquivo pessoal



Caracteriza-se por ser um peixe não formador de cardumes, possui hábito marinho epipelágico e migratório, de grande distribuição geográfica (Figura 2), encontrado em todos os oceanos, exceto no leste do Pacífico, sazonalmente em águas quentes das regiões temperadas e em todo o litoral brasileiro (DITTY; SHAW, 1992).

Figura 2. Distribuição geográfica mundial da espécie *Rachycentron canadum* indicando sua presença nos locais sombreados.

Fonte: (SHAFFER; NAKAMURA, 1989).



Externamente é caracterizado por possuir um corpo alongado e fusiforme, que de forma geral apresenta coloração acinzentada, com listras laterais nas cores branca e preta. Entre fêmeas e machos não existe dimorfismo sexual externo e quanto à maturidade sexual, as fêmeas estão aptas para reprodução em torno do seu terceiro ano de vida, enquanto os machos requerem menor tempo, por volta dos dois anos de idade. É um peixe estritamente carnívoro, alimentando-se de crustáceos, alguns invertebrados bentônicos e outros peixes. Ambientes que proporcionam faixas de temperatura e salinidade entre 16,8 à 32,0 °C e 22,0 a 44,5 ppm, respectivamente, se tornam ideais para o desenvolvimento natural da espécie (SHAFFER; NAKAMURA, 1989).

O bijupirá é conhecido por ser um peixe com fins recreativos, como a pesca esportiva, mas também costuma ter sua captura acidentalmente, tornando-se fauna acompanhante (SHAFFER; NAKAMURA, 1989; DITTY; SHAW, 1992). No entanto, houve uma transformação dessa realidade e a espécie se tornou apreciada no mercado da produção de pescado, seja de origem cativa ou da pesca extrativa. A forma de captura extrativa do bijupirá é realizada através de linha-de-mão, covos, redes de emalhar e caça submarina (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011).

Espécie promissora para a aquicultura marinha no sistema *off-shore*, tanques escavados e gaiolas flutuantes, devido as suas características zootécnicas, se tornou um peixe requisitado por este setor pois apresenta alta capacidade para ganho de peso em curto período (SUN;CHEN, 2006), tem processo de desenvolvimento bem sucedido na larvicultura (HOLT; FAULK; SCHAWARZ, 2007), reproduz-se naturalmente, sem indução à desova e alto índice de fecundação (FRANKS *et al.*, 2001; ARNOLD; KAISER; HOLT, 2002), tem fácil adaptação às dietas disponíveis no mercado, boa aceitação aos sistemas de cultivo no qual são submetidos e carne branca de altíssima qualidade (LIAO *et al.*, 2004). Após cerca de 10 a 12 meses de cultivo o seu peso pode atingir cerca de 6 a 8 kg, tempo adequado para a despesca, onde todas as partes do corpo podem ser utilizadas, tornando-se um produto de alto valor econômico (HUANG; MIAO; HIEU, 2011).

Taiwan foi o primeiro país a dar início ao cultivo da espécie nos anos de 1990 em gaiolas no mar (HUANG; MIAO; FAROK, 2008), seguido de países como a China, Vietnã e outros no Sudeste da Ásia. Recentemente a aquicultura voltada ao *R. canadum* se tornou muito mais popular devido ao sucesso da tecnologia de propagação artificial e eficiência na produção larval (HUANG *et al.*, 2011).

Com todo o sucesso do bijupirá na aquicultura mundial, o Brasil, país que detém extremo potencial para o desenvolvimento e solidificação da atividade aquícola, deu início aos empreendimentos relacionados à espécie em questão, mesmo que a maioria destes esteja ainda sob fase experimental, pois atualmente esta é considerada a espécie marinha que melhor apresenta condições para ser produzida comercialmente.

Todas as informações e pesquisas geradas a partir do interesse inicial, em relação ao cultivo do *R. canadum*, aprofunda os estudos sobre a espécie e tem fundamental contribuição acerca do conhecimento de suas populações naturais.

3.2 Aquicultura marinha no Brasil – Cultivo do bijupirá

Ao seguir o ritmo da tendência mundial, a aquicultura brasileira tem crescido

significativamente nos últimos anos, em especial a maricultura (cultivo exclusivo de organismos aquáticos marinhos ou águas estuarinas), como suprimento da demanda de pescado, onde num passado recente poderia ser suprida por meio da pesca extrativa, mas no cenário atual não se torna possível devido às condições ambientais adversas e a crítica situação dos estoques das populações naturais de peixes que foram sobreexploradas.

Segundo a FAO (2015a), a produção mundial do bijupirá, considerando apenas a aquicultura, atingiu 41.774 toneladas em 2012, representando um aumento de 63,1% em comparação a 2008 que obteve 26.386 toneladas, sendo observado a rápida expansão no mercado. No Brasil, até então só existem dados referentes à pesca por captura direcionada à espécie e esta ainda é considerada de baixa produção, com cerca de 930,4 toneladas em 2011, de acordo com o boletim final divulgado pelo (BRASIL, 2014).

O Brasil melhorou o seu *ranking* global significativamente nos últimos anos e atualmente se encontra no 12º lugar dentre os principais produtores, totalizando 707.461 mil toneladas da sua produção aquícola anual (FAO, 2014a; 2014b).

Mesmo dispondo de condições favoráveis e de um mercado consumidor em potencial, o Brasil não ocupa uma posição de destaque no panorama da maricultura mundial, por falta de estrutura quanto aos métodos utilizados no cultivo, ainda que haja espaço para modernização e expansão do setor. Os dados mais recentes divulgados sobre a maricultura, segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2011), apontam que no Brasil foi produzido cerca de 84.214,3 toneladas de organismos aquáticos em 2011, porém esse número refere-se à carcinocultura e malacocultura, pois o cultivo de peixes marinhos ainda é incipiente, apesar da sua característica promissora, principalmente quando relacionada ao bijupirá, que possui dados mais significativos de comercialização somente proveniente da pesca por captura.

Em razão da importância do setor, tanto a nível mundial e local, as perspectivas de crescimento da aquicultura marinha brasileira tendem a explorar todo o seu potencial. Segundo a FAO (2013), em um relatório divulgado no qual foi avaliado o potencial da maricultura sob o ponto de vista espacial, o Brasil

encontra-se entre os três principais países, incluindo China e Índia, que reúnem critérios fundamentais no sucesso de empreendimentos aquícolas do tipo *offshore*: profundidade da água, velocidade de correntes marítimas e área econômica (custo/benefício). O bijupirá é uma das espécies que se encaixa perfeitamente no sistema de cultivo *offshore* em gaiolas e/ou tanques-redes em ambiente estuarino, tornando-se a principal espécie para este investimento.

No Brasil, Sampaio *et al.* (2011) relataram pela primeira vez a taxa de crescimento do bijupirá cultivados em gaiolas em um experimento realizado em Angra dos Reis – RJ, no qual foi possível observar resultados parecidos a estudos realizados por países que já detém a tecnologia avançada no cultivo da espécie, no qual apresentaram peso médio final de 4,2 kg após 12 meses.

Tendo em vista as perspectivas para a produção comercial de bijupirás no Brasil, o país apresenta condições ambientais e infraestrutura favoráveis, incluindo dados com base na reprodução em cativeiro que apresenta resultados satisfatórios, embora as etapas de larvicultura e engorda ainda sejam instáveis e consideradas como desafios a serem vencidos quando comparados a outros países (CAVALI *et al.*, 2011).

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2014) o governo vem estabelecendo estratégias para fomentar o cultivo do bijupirá via iniciativas de demarcação de parques aquícolas direcionados a áreas próprias para o cultivo exclusivo da espécie. Os estudos de demarcação desses locais, com o auxílio da Bahia Pesca, estão em fase de conclusão no Estado da Bahia e abrange um total com cerca de 15.600 ha de área compreendida favorável. Ainda, inserido no contexto sob o aspecto de áreas destinadas ao cultivo da espécie é relevante considerar a temperatura da água como característica determinante na atividade, no qual uma maior produtividade está diretamente ligada a sobrevivência, taxas de crescimento e conversão alimentar (CAVALLI; HAMILTON, 2009). Este fator corresponde as ações de incentivo das políticas públicas nas quais o governo tem se empenhado para a implantação de projetos aquícolas em ambientes propícios ao cultivo, localizados principalmente entre as regiões Norte e Sudeste, o que também favorece a consolidação da atividade (BRASIL, 2014).

Além dos estudos de demarcação de áreas, o governo, por meio do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013), pelo meio de editais, tem fornecido apoio financeiro em projetos de pesquisa científicos e tecnológicos com o objetivo de legitimar e prosperar a atividade aquícola com base na exploração e uso sustentável dos recursos biológicos que causem menor impacto ao ambiente. Somado a essas iniciativas está o incentivo à pesquisa no setor do conhecimento e melhoramento genético, a fim de monitorar a estrutura das populações selvagens e cultivadas da espécie que tende se tornar mais uma ferramenta de estudo auxiliar para efetivar a aquicultura marinha como sustentável. Considerando-se o crescente aumento populacional global, a demanda por alimento solicitada tende a atingir números cada vez maiores, e este seguimento baseado na utilização de organismos vivos, tratando-se de um recurso genético de uso potencial, tanto presente e quanto futuro, carente de atenção e direcionamento que conduza ao uso consciente, manejo e monitoramento da sua exploração e conservação.

A aquicultura brasileira encontra-se em um período de desenvolvimento sendo uma potência competitiva para o mercado internacional, atraindo atenção para o investimento de empresas privadas e fortalecendo-se a partir da criação do Ministério da Pesca e Aquicultura, que propicia a organização do setor e conseqüentemente resultará no aumento da produção e geração de empregos nos próximos anos (FAO, 2015b). Diante deste cenário a exigência no fornecimento de peixes de melhor qualidade na piscicultura nacional tende a ser um critério relevante para a produção e conseqüentemente evidencia a necessidade de intervenção e aplicação de tecnologias genéticas (BRASIL, 2012).

3.3 Recursos genéticos - Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares têm essa definição, pois são ferramentas utilizadas para detectar variações no genoma, aumentando as possibilidades de análise genética dos organismos (BORÉM e CAXETA, 2009). Para Toro *et al.*, (2009), um dos primeiros marcadores utilizados voltados à produção animal foram as aloenzimas, porém elas apresentavam limitações, como o seu baixo nível de

polimorfismo, e por conta disso logo foram criadas ferramentas com marcadores que tinham acesso direto ao DNA (em especial o DNA nuclear). A partir do desenvolvimento das tecnologias com base nos marcadores moleculares foi possível quantificar de forma mais precisa a diferença genética existente entre populações e indivíduos, como também identificar e acessar as regiões do genoma que continham essas informações (HILSFORF, 2011).

Após a criação da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), descrita por Kary Mullis em 1983, houve uma revolução no uso e progresso dos mais diferenciados tipos de marcadores genéticos e este acontecimento possibilitou posteriormente o sequenciamento dos genomas de diferentes espécies por completo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Desde então, independente das técnicas mais modernas utilizadas no sequenciamento total de genomas, que são aplicados nos laboratórios em diversos locais do mundo, os marcadores moleculares ainda são os métodos mais empregados em estudos populacionais (HILSDORF; ORFÃO, 2011), com a premissa de estabelecer o tipo de marcador disponível que seja mais vantajoso e apropriado em resposta à pergunta biológica que se busca esclarecer (FINGER; KLANK, 2010).

Dentre os marcadores mais utilizados atualmente é possível citar: *Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD, *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP, *Simple Sequence Repeat* – SSR, *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR, *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP, *Expressed Sequence Tags* – EST e os marcadores de DNA mitocondrial. O conhecimento e as ferramentas geradas devido ao progresso na genética molecular proporcionaram aprofundar estudos filogenéticos e populacionais, identificar espécies, caracterizar a biodiversidade de diferentes ecossistemas e avaliar a variabilidade genética existente dentro e entre populações de animais de ambiente natural e aqueles de interesse zootécnico (BRASIL, 2009).

3.4 Marcadores ISSR

Descrito inicialmente por Zietkiewicz *et al.* (1994) e Gupta *et al.* (1994), o ISSR representa uma das classes de marcadores moleculares mais recente

utilizados em estudos genéticos. A técnica utiliza iniciadores de repetição di-, tri- ou tetranucleotídica para amplificação do DNA em uma determinada porção do genoma localizada entre dois microssatélites idênticos de orientação reversa à cadeia de DNA, que estão amplamente distribuídos no genoma e que não necessitam de conhecimento prévio da sequência do DNA (ROUX *et al.*, 2007).

De caráter dominante, o marcador apresenta vantagens quando comparada ao emprego tradicional dos microssatélites, uma vez que são utilizados *primers* arbitrários que reconhecem qualquer região do genoma de interesse. A estratégia aplicada com o ISSR é particularmente atrativa pois evita a necessidade de clonagem e sequenciamento inicial quando baseado nos microssatélites, tornando-a menos dispendiosa com relação aos custos e tempo (REDDY; NAGARAJU; ABRAHAM, 1999).

A técnica tem sido amplamente utilizada com os mais diversos tipos de organismos. Botânicos e zoólogos de espécies terrestres até autores de trabalhos abrangendo invertebrados e vertebrados marinhos, ratificam que os estudos realizados demonstraram a eficiência dessa ferramenta na avaliação da variabilidade genética, discriminação de populações, espécies e subespécies, chegando a obter marcadores ISSR espécie-específico para peixes (CASU *et al.*, 2009).

Dentre as vantagens na aplicação do ISSR afirma-se que ele é um método com baixo custo, simples e rápido, que pode gerar diferentes perfis utilizando apenas um *primer* para análise genômica (CHIU *et al.*, 2014), produz fragmentos com grande reprodutibilidade, se comparados a outros marcadores com base em PCR, não requerem grande infraestrutura com equipamentos de laboratório (SOUZA *et al.*, 2008).

Assim, o emprego dos marcadores moleculares ISSR nos últimos anos tornou-se altamente solicitado e aplicado para estudos de variação intra-específica em populações da fauna marinha, identificação de espécies de peixes, avaliação de estrutura populacional, variação e diferenciação genética entre populações do ambiente natural e cultivadas e relações filogenéticas (CHIU *et al.*,

2012; CHIU *et al.*, 2014; KUMLA *et al.*, 2012; XIAOXIAO *et al.*, 2011; HANIFFA *et al.*, 2014).

Diante dessas características se torna possível o uso do mesmo com a espécie *R. canadum* a fim de caracterizar a diferenciação genética existente intra e inter-específica na costa brasileira, como também a relação entre as populações cativas e nativas.

3.5 Estrutura genética de populações de peixes

A estrutura genética de uma determinada população é estabelecida a partir da formação de indivíduos da mesma espécie que raramente se distribuem de forma homogênea no espaço e convivem numa área geográfica de tamanho suficientemente restrito, para que esses indivíduos tenham a oportunidade de cruzar aleatoriamente com qualquer outro do sexo oposto da mesma espécie, quase sempre formando populações, agregados, bandos, colônias ou outro tipo de associação (ALFENAS *et al.*, 2006).

De acordo com Turchetto-Zolet *et al.* (2013), a constituição genética e demográfica das populações determina sua estrutura genética por meio de ações e interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos, onde a partição da variabilidade genética e os seus níveis dependem das forças evolutivas que estejam predominando no contexto ecológico.

Diante da crescente demanda em estudos voltados para a conservação de peixes (ALIABADI *et al.*, 2008; CHIU *et al.*, 2014; PRUETT *et al.*, 2005), a genética se tornou uma ferramenta importante para direcionar esses esforços ao analisar os diferentes parâmetros que podem alterar a constituição genética dos indivíduos que formam uma população, tais como deriva, fluxo gênico, mutação, migração, efeito fundador, seleção e conseqüentemente evolução.

Segundo Batista (2010), a conservação de uma espécie ocorre por meio do conhecimento da sua biologia e ciclo de vida que incluem movimentos de dispersão, comportamento reprodutivo e processos históricos aliados a fatores

ambientais, no qual o conjunto desses fatores são os maiores responsáveis para manter a diversidade genética nas populações.

Na Ictiogenética, o uso de marcadores moleculares se tornou bastante relevante na caracterização da diversidade populacional de peixes nativos e cativos, concentrando também sua aplicação nos estudos de variabilidade genética e descrevendo como esta é distribuída entre e dentro das populações, auxiliando na identificação de espécies, no entendimento da filogeografia, aspectos evolutivos, manejo e reprodução. São inúmeros os trabalhos realizados voltados à estrutura de populações em peixes, tais como: Domingos *et al.*, (2014); Freitas, (2010); Galletti, (2009); Ribeiro, (2012); Rossini, (2010); Yang; Gao; Miao, (2011). Conforme o interesse de estudo, diferentes abordagens metodológicas na detecção de dados genéticos, podem ser obtidas a partir de marcadores moleculares disponíveis (FREITAS, 2010).

3.5.1 Análise da estrutura genética com marcadores moleculares

Utilizar frequências alélicas provenientes de diferentes marcas moleculares (*loci*) se tornou comum ao quantificar distâncias genéticas, medidas de heterozigosidade, grau de fixação e correlação intergenotípica para avaliar o grau de diversidade que expressa a similaridade e o distanciamento genético entre populações (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2008).

Para Turchetto-Zolet *et al.* (2013), os métodos mais popularmente utilizados para quantificar a diferenciação genética entre populações estão baseados na estatística- F , introduzida primeiramente por Sewal Wright (1889-1988), que utiliza os coeficientes de endocruzamento para dividir a variação genética dentro e entre populações, sendo a quantidade de endocruzamento em uma população devida à diferenciação das populações (F_{ST}) o mais conhecido. Esses índices de fixação têm sido utilizados como indicadores da diferenciação genética entre populações por meio do conceito de estrutura populacional que é gerada pela perda de variação genética devido aos efeitos de deriva genética, apresentando como resultado a diminuição da heterozigosidade nas subpopulações quando comparada a heterozigosidade esperada a partir da população original

(HILSDORF, 2013). Em complemento à F , que parte do pressuposto na sua análise a existência de somente um par de alelos sem mutação, Nei (1973) estendeu o índice para o caso de múltiplos alelos denominando-o de coeficiente de diferenciação gênica (G_{ST}), ou seja, a razão da diversidade gênica interpopulacional esperada pela diversidade gênica total esperada, onde o valor de G_{ST} pode ser estimado pelo uso das médias de diversidade gênica para vários locus (HILSDORF, 2013; SÁNCHEZ, 2008).

Medida também frequente em trabalhos baseados em marcadores moleculares, a estatística H de Nei (1972) é comum em estudos genéticos. No que se refere à medida de diversidade de Nei (H), o autor baseou-se no conceito de heterozigosidade gênica/alélica para quantificar a diversidade genética entre e dentro das unidades experimentais, podendo ser aplicado a qualquer tipo de organismo, desde que a frequência gênica possa ser determinada (SÁNCHEZ, 2008). A probabilidade que em um “loco”, dois alelos quaisquer, escolhidos ao acaso em uma população, sejam diferentes um do outro, a média encontrada de heterozigosidade em todos os locus é uma estimativa da extensão da variabilidade genética em uma população (HILSDORF, 2013).

Outro tipo de análise a ser aplicada nestes casos é o índice de Shannon. Sánchez (2008) afirma que a função proposta por Shannon-Wiener mede a diversidade ou riqueza de espécies em estudos ecológicos no qual adequa-se em análises em que as amostras são coletadas ao acaso, considerando a riqueza das espécies a partir do cálculo de diversidade genotípica ou fenotípica de uma determinada população. Segundo o autor, por meio do cálculo de diversidade isola-se o componente equabilidade e gera-se o quanto a diversidade encontrada para um determinado local difere da diversidade hipotética máxima possível para o mesmo.

Diante das diferentes metodologias para inferir a diversidade genética dos mais diversos organismos, a análise de variância molecular (AMOVA) é o método mais recente utilizado para determinar a variabilidade genética inter e intrapopulacional. Segundo Excoffier; Smouse; Quattro, (1992), a AMOVA produz estimativas de componentes de variância que são análogos à estatística de F , refletindo a

correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica e que tem como objetivo testar hipóteses de estruturação populacional, caracterizando-se por constituir uma representação coerente e flexível para análise de dados moleculares. Os três níveis hierárquicos de diferenciação populacional calculados na AMOVA são: entre grupos (F_{CT}), entre populações dentro de grupos (F_{ST}) e dentro das populações (F_{SC}), além de fornecer o coeficiente de endocruzamento específico (F_{IS}) (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

Entretanto, Pessoni, (2007) alega que o método apresenta uma relação direta com a estatística de F , estando sujeito às mesmas limitações de pressuposições, no qual assume-se que os acasalamentos entre os indivíduos que compõem as populações ocorram completamente ao acaso e que não haja endogamia. A AMOVA possui sua aplicação de forma fácil que independe da situação, constituindo uma estrutura coerente e flexível para a análise dos dados moleculares (Moreira, 2006).

Portanto, a análise de variância molecular se caracteriza por ser capaz de estudar a diversidade entre populações a partir de dados moleculares (marcadores dominantes, co-dominantes ou de sequência) e também testar hipóteses a respeito de tal diferenciação.

3.6 Mecanismos de variabilidade genética em peixes

Se os fatores determinantes que envolvem a estrutura genético-populacional dependem de forças evolutivas e o tempo viável para que esses fenômenos ocorram (CHAKRABORTY; LEIMAR, 1987), no caso dos peixes, que estabelecem populações naturais, em especial no ambiente marinho, a sua variabilidade e estruturação genética é influenciada principalmente pelo fluxo gênico e dispersão larval, ou seja, efeito migratório de indivíduos e fixação dos genes em um determinado habitat/população, respectivamente. Neste caso a distribuição de uma determinada espécie está associada à estrutura espacial das populações conectadas pela troca de larvas entre as populações, tornando-se um parâmetro central da estruturação dessas comunidades (ORICCHIO, 2013).

Para os peixes que possuem sua reprodução e desenvolvimento de forma indireta, o período larval planctônico e pelágico (ausência de movimentação ativa) pode se mostrar ausente ou variar de dias até um ano sob efeito de correntes oceânicas e por meio desse comportamento é definido o período e extensão da dispersão dos indivíduos que irão constituir uma determinada população. Por muito tempo acreditou-se que a inexistência de barreiras físicas no ambiente marinho proporcionasse uma estruturação homogênea para as populações de espécies marinhas, no entanto os estudos mais recentes contrapõem essa condição (COWEN, 2006; GALETTI *et al.*, 2008; KNUTSEN *et al.*, 2011; HENRIQUES *et al.*, 2014). Em conjunto, os resultados que têm sido obtidos fornecem evidências, ainda que não completamente esclarecidas, de que as subpopulações de organismos marinhos podem estar isoladas em escalas espaciais menores do que se pensava anteriormente.

Aliado aos movimentos de dispersão, o fluxo gênico também se destaca como efeito da variação genética, pois ocorre por meio da movimentação ativa dos organismos (BENEVIDES, 2011). Conforme Gomide, (2008), a migração é um fator importante, já que movimenta genes de uma população para outra, que geralmente afeta em proporções maiores as pequenas populações quando comparado suas implicações às populações menores. Diante disso, a variabilidade genética se comportará de forma proporcional quando submetida ao fluxo gênico, ou seja, quanto maior o número de migrantes entre os grupos, maior a integração entre eles.

No ambiente marinho existem casos em que o fluxo gênico e a formação de populações praticamente panmíticas são favorecidas em razão do seu habitat e nesses exemplos não existem barreiras físicas ou ecológicas que reduzam a conectividade populacional, porém estima-se que grande parte da diversidade marinha possa ser resultado de especiações simpátricas (ORICCHIO, 2013). Tratando-se da espécie em estudo, o bijupirá, é considerado um peixe migrador de grandes distâncias e/ou pode associar-se a outros animais marinhos migratórios, este comportamento o ajudaria a manter uma maior conectividade populacional (PHINCHONGSAKULDIT *et al.*, 2013).

Diferente da abordagem voltada para os principais mecanismos de variabilidade genética em populações naturais, ao analisar a variação genética na aquicultura, os principais fatores que influenciam neste cenário são o efeito fundador e seleção, ou seja, a formação de uma nova população estabelecida a partir de poucos indivíduos e a escolha não intencional dos mesmos que sejam aparentados e apresentem melhores características fenotípicas ou reprodutivas, respectivamente. Ao planejar o estoque fundador é necessário haver uma quantidade relevante de indivíduos que representem a verdadeira variabilidade genética existente da espécie e se possível que estes sejam capturados em localidade diferentes para que se torne provável ampliar a dissimilaridade genética entre eles. Quando o número efetivo é pequeno, baixa variação genética e futuros cruzamentos endogâmicos levam à diminuição da produtividade (HILSDORF; ORFÃO, 2011). Segundo os mesmos autores, a variabilidade é o ponto de partida para mensurar as diferenças genéticas entre populações e iniciar um processo de seleção, que deve ser monitorado pelo produtor.

De acordo com Dias (2012), o manejo inadequado ou erro inicial diante da escolha do estoque doador, no caso os peixes que formarão o plantel de reprodutores, ocasiona sérios problemas genéticos chegando até inviabilizar a atividade a médio e longo prazo. Para evitar problemas direcionados à seleção, o gerenciamento zootécnico e manejo por meio da utilização de “tags” pode ser um grande aliado na identificação dos peixes, pois permite o monitoramento individual de diversos parâmetros (peso, idade, tamanho, comportamento reprodutivo e etc) e possibilita a escolha dos indivíduos para produção e início de programas de melhoramento (BRASIL, 2012).

3.7 Variabilidade genética na espécie *Rachycentron canadum*

Tratando-se de uma espécie de interesse comercial o *R. canadum* tem sido objeto de estudo em pesquisas com distintos propósitos e segmentos, em que tem a genética como área de estudo contemplada e conta com o auxílio das classes de diferentes marcadores moleculares.

Pruett *et al.*, (2005), ao desenvolverem microssatélites utilizados em estudo

com a espécie, proporcionaram instrumentos úteis para pesquisas futuras a fim de distinguir e identificar populações selvagens e cultivadas no intuito de garantir a comercialização do bijupirá e evitar futuros conflitos legais. Os microssatélites são indicados para esse estudo devido a sua herança mendeliana, codominância e altos níveis de polimorfismo (PRUETT *et al.*, 2005). Sob a mesma tendência, Renshaw *et al.* (2006), em um relatório técnico, descreveram protocolos simples e diretos para utilizar microssatélites em painéis multiplex com três espécies de peixes propícias para aquicultura, inclusive o bijupirá.

Renshaw *et al.* (2006) relataram que nesta técnica há uma maior capacidade de genotipagem em uma única amplificação simultânea e análise de vários *loci*, o que reduz custos e o tempo na técnica quando comparado ao uso dos géis em microssatélite individual. Atrelado ao método, a aplicação do multiplex elucida questões como identificação de híbridos e linhagens, graus de parentesco, estimativa de diversidade genética, mapeamento de *loci* de características quantitativas e seleção assistida por marcadores.

Com o subsídio dos trabalhos de Pruettt *et al.* (2005) e Renshaw *et al.* (2006), o estudo realizado por Aliabadi *et al.* (2008) acresceram informações sobre níveis de polimorfismo genético entre populações naturais iranianas do *R. canadum* na região do Golfo Pérsico e Mar de Oman, com aplicação de marcadores microssatélites. Já Phinchongsakuldit *et al.* (2013) analisaram por meio de marcadores SSR's as populações de *R. canadum* das águas tailandesas com objetivo de observar sua estrutura populacional e promover o conhecimento a respeito das populações naturais que estão diretamente ligadas a exploração da pesca e aquicultura, e ao final no estudo mostraram níveis semelhantes de diversidade genética com índices de diferenciação populacional baixa e em sua maioria não significativa.

O uso dos marcadores do tipo RAPD e ISSR foi empregado por Chiu *et al.* (2012) em um estudo com o bijupirá a fim de identificar os peixes de origem de populações naturais e cultivadas, como também fornecer informações a respeito da diversidade genética populacional para gestão dos recursos naturais e manejo dos estoques cultivados. Foram desenvolvidos e testados iniciadores RAPD e

ISSR que comprovaram a sua eficácia proposta para o objetivo inicial. A utilização de marcadores moleculares de DNA nuclear, assim como os marcadores de DNA mitocondrial, já está presente em estudos para obter maior conhecimento da espécie, principalmente em estudos filogenéticos e populacionais.

Nepomuceno *et al.*, (2013) e Nepomuceno *et al.*, (2014), por meio da técnica de sequenciamento de bases da região mitocondrial do citocromo B (CYT B) e do gene mitocondrial ATP6, respectivamente, analisaram de forma comparativa a diferenciação genética de populações selvagens e cativeiro de algumas regiões da costa brasileira com o intuito de fornecer subsídios para futuros programas de melhoramento e conservação do *R. canadum* no país.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006.

ALIABADI, M. A. S.; GILKOLAEI, S. R.; SAVARI, A.; ZOLGHARNEIN, H.; NABAVI, S. M. B. Microsatellite polymorphism in Iranian populations of cobia (*Rachycentron canadum* G.). **Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 775-780, 2008.

ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 2, p. 205-208, 2002.

BATISTA, J. S. **Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo**. 2010. 148 f. Tese (Genética, conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus – Amazonas.

BENEVIDES, E. A. **Diversidade genética, conectividade populacional e a conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) na Costa Atlântica da América do Sul**. 2011. 93 f. Dissertação (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**, Planaltina - DF, 2009. 33 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília, 2011. 60 p.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Genética na piscicultura – importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA**, Brasília - DF, 2012. 34 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Balanço 2013: pesca e aquicultura**. Brasília, 2013. 14 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Cultivo de Bijupirá em Águas Mari-nhas da União**. Brasília, 2014. 20 p.

CASU, M.; LAI, T.; CURINI-GALLETTI, M.; RUIU, A.; PAIS, A. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 368, p. 147-152, 2009.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 64-69, dez. 2009.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 155-164, 2011.

CHAKRABORTY, S. M.; LEIMAR, O. **Genetic variation within a subdivided population**. In: RYMAN, N.; UTTER, F. (ed). Populations genetics and fishery management, University of Washington Press, Seattle, 1987. p. 89-120.

CHENG-TING, H.; MIAO, S.; FAROK, A. Economic analysis of cobia's (*Rachycentron canadum*) phase nursery stage culture in Taiwan. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, v. 35, n. 2, p. 133-146, 2008.

CHENG-TING, H.; MIAO, S.; HIEU, T. K. Bioeconomic analysis of improving management productivity regarding cobia *Rachycentron canadum* cage culture in Taiwan. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, v. 38, n. 3, p. 239-242, 2011.

CHIU, T-S.; SU, Y-C.; LIN, H-C., HSU, C-K. **Molecular electrophoretic technique for authentication of the fish genetic diversity**. In: MAGDELDIN, S. *Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*. Japão, 2012. p. 85-96.

CHIU, T-S.; KUO, C-W.; LIN, H-C.; HUANG, D-S.; WU, P-L. Genetic diversity of ivory shell (*Babylonia areolata*) in Taiwan and identification of species using DNA-based assays. **Food Control**, n. 30, p. 1-9, 2014.

COWEN, R. K. Scaling of connectivity in marina populations. **Science**, v. 311, p. 522-527, 2006.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1. ed. Viçosa: UFV, Viçosa, 2008, 581 p.

DIAS-JR, E. A. **Estrutura genética populacional de *Lutjanus analis* – cioba e *Lutjanus jocu* – dentão (Lutjanidae) ao longo do litoral brasileiro**. 2012. 95 f. Tese (Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – Rio Grande do Norte.

DITTY, J. G.; SHAW, R. F. Larval development, distribution, and ecology of cobia *Rachycentron canadum* (Family: Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 90, p. 668-677, 1992.

DOMINGOS, T. J.; MORAES, L. N.; MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; VENERE, P. C.; 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**, v. 13, n. 3, p. 7979-7991, 2014.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **El estado mundial de la pesca y agricultura**, Roma, 2010.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **A global assessment of offshore mariculture potential from a spatial perspective**, Roma, 2013.

FAOa. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**, Roma, 2014.

FAOb. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fishery and aquaculture statistics**, Roma, 2014.

FAOa. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cultured aquatic species information programme: *Rachycentron canadum***. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Roma, 2007-2015. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentron_canadum/en>. Acesso em: 13 jan. 2015.

FAOb. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Visión general del sector acuícola nacional: Brasil**. In: Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Roma, 2004-2015. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/es>. Acesso em: 24 jan. 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 200 p.

FINGER, A.; KLANK, C. **Molecular methods: blessing or curse?** In: HABEL, J. C.; ASSMANN, T. *Relict Species: Phylogeography and conservation biology*. 1. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 451 p.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2)**. São Paulo: Museu de Zoologia da USP, 1980. 90 p.

FRANKS, J. S.; OGLE, J. T.; LOTZ, J. M.; NICHOLSON, L. C.; BARNES, D. N.; LARSON, K. M. Spontaneous spawning of cobia, *Rachycentron canadum*, induced by human chorionic gonadotropin (HCG), with comments on fertilization, hatching, and larval development. **Proc. Carribb. Fish. Int.**, v. 52, p. 598-609, 2001.

FREITAS, L. A. C. M. **Diversidade genética em dourado (*Salminus brasiliensis*, Curvier, 1816), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-Grossense**. 2010. 131 f. Tese (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo.

GALETTI-JR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S. N.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T. & MOLINA, W. F. **Genética da conservação brasileira**. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de genética. 2008. p. 199-229.

GALLETTI, E. S. **Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) na calha do Rio Amazonas**. 2009. 67 f. Dissertação (Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus – Amazonas.

GOMIDE, J. M. **Estimativa dos parâmetros genéticos de caracteres morfométricos em guppy (*Poecilia reticulata*)**. 2008. 49 f. Dissertação (Genética) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia – Goiás.

GUPTA, M.; CHYI, Y-S. ROMERO-SEVERSON, J. OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.** v. 89, p. 998-1006, 1994

HANIFFA, M. A.; ABIYA, J. S.; MILTON, J.; RAMESH, K. BHAT, A. A.; CHELLIAH, A. Morphometric, meristic and ISSR marker systems for species identification and evolutionary analysis in five Indian Channids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 131-136, 2014.

HENRIQUES, R.; POTTS, W. M.; SANTOS, C. V.; SAUER, W. H. H.; SHAW, P. W. Population connectivity and phylogeography of a Coastal Fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current Region: Evidence of an ancient variant event. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-11, fev., 2014.

HILSDORF, A. W. S. Ferramentas moleculares aplicadas à pesca e aquicultura. In: X REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE PESCA, 10. 2011, São Paulo. **Anais...**São Paulo: Instituto de Pesca, 2009, p. 14-17.

HILSDORF, A. W. S.; ORFÃO, L. H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 317-324, 2011.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. 2013. 159 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – São Paulo.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, p. 181-187, 2007.

HUANG, C-T.; MIAO, S.; FAROK, A. Economic analysis of Cobia's (*Rachycentron canadum*) phase nursery stage culture in Taiwan. **Journal of Fishery Society in**

Taiwan, v. 35, n. 2, p. 133-146, 2008.

HUANG, C-T.; MIAO, S.; HIEU, T. K. Bioeconomic analysis of improving management productivity regarding cobia *Rachycentron canadum* cage culture in Taiwan. **Journal of Fishery Society in Taiwan**, v. 38, n. 3, p. 239-262, 2011.

LIAO, I. C.; TING-SHIH, H.; WANN-SHENG, T.; CHENG-MING, H.; SU-LEAN, C.; LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155-165, 2004.

KNUTSEN, H.; OLSEN, E. M.; JORDE, P. E.; ESPELAND, S. H.; ANDRÉ, C.; STENSETH, N. C. Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes 'biologically meaningful'? A case study of coastal Atlantic cod. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 768-783, 2011.

KUMLA, S.; DOOLGINDACHBAPORN, S.; SUDMOON, R. SATTAYASAI, N. Genetic variation, population structure and identification of yellow catfish, *Mystus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 5021- 5210, 2012.

LV, Y-P.; HU, Z-H.; YANG, X-Q.; WANG, C-H. Analysis of genetic variation in selected generations of "Whole Red" pattern *Cyprinus carpio* var. color using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 243-249, 2012.

MOREIRA, R. F. C. **Estrutura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Monilophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2006. 128 f. Tese (Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – São Paulo.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p. 3321-3323, 1973.

NEPOMUCENO A. R.; FARIA, D. A. de.; CAVALCANTI, L. C. G.; BIAZIO, G. R. de.; SILVA, N. M. A. da.; SANCHES, E. G.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; BRAVO, I. A. F.; FOGAÇA, F. H. S.; McMANUS, C.; CAETANO, A. R.; PAIVA, S. R. Filogeografia de *Rachycentron canadum* em cinco Estados da costa brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 4, 2013, Belém. **Anais...** Belém, PA, 2013.

NEPOMUCENO, A. R.; FARIA, D. A. de.; CAVALCANTI, L. C. G.; BIAZIO, G. R. de.; SILVA, M. N. A. de.; SANCHES, E. G.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; BRAVO, I. A. F.; FOGAÇA, F. H. S.; McMANUS, C.; CAETANO, A. R.; PAIVA, S. L. Análise filogeográfica de populações selvagens e em cativeiro do bijupirá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 3, 2014, Santos. **Anais...**Santos, SP, 2014.

NGUYEN, T. T. T.; BRIAN DAVY, F.; RIMMER, M. A.; DE SILVA, S. S. Use and

exchange of genetic resources of emerging species for aquaculture and other purposes. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 260-274, 2009.

ORICCHIO, F. T. **Como são formadas as barreiras ecológicas no ambiente marinho?**. In: Ensaio elaborado pelos alunos durante a disciplina: fundamentos teóricos em ecologia e evolução. Diadema: Universidade Federal de São Paulo. 2013. 92 f.

PESSONI, L. A. **Estratégias de análise da diversidade em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp. L.*)**. 2007. 174 f. Tese (Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

PHINCHONGSAKULDIT, J.; CHAIPAKADEE, P.; COLLINS, J. F.; JAROENSUTASINEE, M.; BROOKFIELD, J. F. Y. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. **Aquaculture International**, v.21, p. 197-217, 2013.

PRUETT, C. L.; SAILLANT, E.; RENSHAW, M. A.; PATTON, J. C.; REXROAD, C. E.; GOLD, J. R. Microsatellite DNA markers for population genetic studies and parentage assignment in cobia, *Rachycentron canadum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 84-86, 2005.

REDDY, K. D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity**, v. 83, p. 681-687, 1999.

RENSHAW, M. A.; SAILLANT, E.; BRADFIELD, S. C.; GOLD, J. R. Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 253, p. 731-735, 2006.

RIBEIRO, A. O. **Identificação molecular de peixes marinhos da região Sudeste e Sul do Brasil com ênfase no estado de São Paulo**. 2012. 81 f. Dissertação (Ciências Biológicas – Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – São Paulo.

ROSSINI, B. C. **Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da bacia do Mogi-Guaçu**. 2010. 140 f. Dissertação (Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo.

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 240-250, 2007.

SAMPAIO, L. A.; MOREIRA, C. B.; MIRANDA-FILHO, K. C.; ROMBENSO, A. N. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the Brazilian coast. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 832-834, 2011.

SÁNCHEZ, C. F. B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 2008. 95 f. Dissertação (Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pieces: Rachycentridae)**. FAO Fisheries Synopsis, 153, U.S. Dep. Commer., NOAA Technical Report NMFS 82, p.21, 1989.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SUN, L.; CHEN, H. Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 426-427, p. 172-180, 2014.

SUN, L.; CHEN, H.; HUANG, L.; WANG, Z.; YAN, Y. Growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) relative to ration. **Aquaculture**, v. 257, p. 214-220, 2006.

TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, p. 174-195, 2009.

YANG, Q.; GAO, T.; MIAO, Z. Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in Northwestern Pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 286-296, 2011.

YAO-PING, L.; ZE-HUI, H.; XIAO-QIN, Y.; CHENG-HUI, W. Analysis of genetic variation in selected generations of “Whole Red” pattern *Cyprinus carpio* var. color using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 243-249, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-193, 1994.

TURCHETTO-ZOLET, J. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L. B. **Guia prático para estudos filogeográficos**. 1 ed. Ribeirão Preto: SBG, Ribeirão Preto -SP, 2013, 105 p.

XIAOXIAO, B.; QIAOLI, Y.; TIANXIANG, G. A. O.; CHUANGJU, L. I. The loss of genetic diversity during captive breeding of the endangered sculpin, *Trachidermus fasciatus*, based on ISSR markers: implications for its conservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, n. 5, p. 958-966, 2011.

CAPÍTULO 1

MARCADORES ISSR NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *Rachycentron canadum*

Marcadores ISSR na caracterização genética de populações da espécie *Rachycentron canadum*

LAIS F. NOVAES¹, ¹NORMA S. EVANGELISTA-BARRETO¹, RICARDO F. C. MOREIRA¹, SORAIA B. A. FONTELES¹

RESUMO – O *Rachycentron canadum* é um peixe marinho de alto valor comercial e ampla distribuição geográfica e carece de estudo genético para o conhecimento da estrutura de suas populações, fator importante para estabelecer a gestão dos recursos genéticos e o melhoramento dos estoques na aquicultura marinha. O objetivo do presente estudo foi verificar a diversidade genética de 155 indivíduos provenientes de populações naturais localizadas na costa do litoral brasileiro e a partir de populações cultivadas, por meio do marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram aplicados nove *primers* que por sua vez geraram 144 *loci* polimórficos. O número de alelos observados, diversidade genética esperada de Nei e índice de Shannon variaram de 1,58, 0,1865 e 0,2855 para as populações nativas e 1,39, 0,1378 e 0,2054 para as populações cativas, respectivamente. Para ambas as populações o fluxo gênico apresentou valores de 2,3555 para as populações nativas e 1,1858 para as populações de cultivo. O índice F_{ST} constatou que existe de moderada (0,19) a alta estruturação (0,38) entre as populações da espécie estudadas e analisadas. De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA) observou-se que a diversidade genética estudada de forma global apresentou nível mais elevado dentro das populações do que entre as populações com 61,54% e 38,46, respectivamente. Ao observar o nível de variação genética das populações nativas e cativas, de acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que a maior variabilidade encontra-se na composição das populações naturais quando comparado às populações cultivadas.

Palavras-chave: aquicultura marinha; bijupirá; conectividade populacional; diversidade; marcador molecular.

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, UFRB. Rua Rui Barbosa, 710 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.
(LFN) novaeslais@hotmail.com; (NSEB) nsevangalista@ufrb.edu.br;
(RFCM) ricardofcm@ufrb.edu.br; (SBAF) soraiafonteles@ufrb.edu.br

ISSR markers in the genetic characterization of *Rachycentron canadum* species populations

ABSTRACT - *Rachycentron canadum* species is a marine fish of high commercial value and wide geographic distribution in need of genetic studies for the future knowledge of its populations structure, major factor to establish the management of the genetic resources and the marine aquaculture stock's improvement. The objective of this study was characterizing the genetic diversity of 155 subjects coming from natural populations located in the Brazilian litoral coast and from reared populations, through ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular marker. Nine primers were applied and they generated 144 polymorphic *loci*. The number of observed alleles, expected genetic diversity of Nei and Shannon index ranged from 1,58, 0,1865 and 0,2855 for the native populations and 1,39, 0,1378 and 0,2054 for captive populations, respectively. To both populations, the genomic flow was low, presenting $N_m=2,3555$ for native populations and $N_m=1,858$ for cultivated populations. The F_{ST} index showed that it exists a moderate (0,19) to high differentiation (0,38) between the studied and analyzed samples. According to the results obtained through the analysis molecular variance (AMOVA), it was observed that the genetic diversity studied global shown higher level inside the populations than between populations with respectively 61,54% and 38,46%. Observing the level of genetic variation of the natural and captive populations, regarding the obtained results, it is possible to say that a higher genetic variation relies in the native populations structure when compared to captive populations.

Keywords: marine aquaculture; cobia; population connectivity; diversity; molecular marker.

Introdução

A espécie *Rachycentron canadum*, pertence a ordem Perciformes, caracteriza-se por ser um seu peixe marinho, pelágico, de hábito alimentar estritamente carnívoro e de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em todos os oceanos, exceto na costa Leste do Pacífico (Shaffer e Nakamura, 1989). Por apresentar uma carne de excelente qualidade, em conjunto com os aspetos zootécnicos favoráveis, torna-se um peixe bastante apreciado e promissor para o desenvolvimento do seu cultivo na piscicultura marinha, principalmente no Brasil. Os dados da FAO (2013) apontam que o cultivo da espécie encontra-se em um estado de crescente expansão, onde os países asiáticos como a China e Taiwan se destacam como os maiores produtores.

O desenvolvimento na produção de juvenis da espécie em laboratório permitiu o início da produção em larga escala, e desde então tem tomado proporções comerciais bastante significativas na indústria da aquicultura (Benetti *et al.*, 2010). Mediante a disponibilidade atual no aprimoramento de tecnologias para criação, crescimento em potencial e mercado das espécies de peixe nativas do litoral brasileiro, hoje o bijupirá reúne as melhores condições para ser produzido comercialmente (Cavalli *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011).

O aumento do interesse no cultivo do bijupirá tem promovido maior ação de captura dos indivíduos selvagens para serem adaptados a um novo ambiente em projetos aquícolas, sendo necessário o acompanhamento de forma criteriosa quanto ao manejo da espécie, tanto em cultivos quanto na natureza, de modo a minimizar os impactos que a diversidade biológica sofrerá, principalmente devido à pouca informação em relação a sua estrutura populacional.

Nguyen *et al.*, (2009) afirmam que ao considerar o uso dos recursos genéticos para a produção sustentável de alimentos é oportuno e imprescindível que essa prática deva receber a atenção e ênfase que merece, já que a biodiversidade deve ser preservada obedecendo ao cumprimento das três diretrizes fundamentais estabelecidas pela Convenção da Diversidade Biológica – CDB que envolvem: a promoção da conservação da biodiversidade, o uso sustentável de seus componentes e a partilha justa e equitativa dos benefícios resultantes da utilização desses recursos.

Estudar a diversidade genética das populações naturais do bijupirá visando

a aquicultura é uma forma de aprimorar a produção dos indivíduos recrutados na formação do plantel de reprodutores, auxiliando no melhoramento genético de futuras gerações dentro dos cultivos. Da mesma forma faz-se relevante o conhecimento da variabilidade genética dos indivíduos que já faz parte dos projetos de reprodução e engorda na piscicultura marinha. Portanto, é preciso estabelecer informações básicas sobre a base genética dos peixes que compõe os cultivos, não somente considerando os programas de melhoramento genético, mas também com o intuito de proteger a diversidade genética dessas populações naturais (Li *et al.*, 2013).

O uso de marcadores moleculares, em especial o *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR tem tido participação em diversos trabalhos que se propõem a estudar a diversidade genética tanto entre populações selvagens, quanto na comparação da diversidade existente entre populações nativas e de cultivo (Xiaoxiao *et al.*, 2011; Lv *et al.*, 2012; Gasmi *et al.*, 2014; Benevides *et al.*, 2014).

Este marcador tem se mostrado eficiente e sido amplamente utilizado em organismos dos mais variados táxons, peixes (Domingos *et al.*, 2014), fungos (Abadio *et al.*, 2012) e plantas (Muthusamy *et al.*, 2008). O método tem como base os marcadores microssatélites, não requerendo conhecimento prévio sobre o genoma. Os ISSR's estão ancorados em sequências de microssatélites, geralmente com 16 a 25pb (pares de base) de comprimento, para amplificar as sequências de diferentes tamanhos que estão localizadas entre os mesmos, utilizando apenas um iniciador por vez à cada amplificação (Domingos *et al.*, 2014). Estudos realizados indicam que a técnica ISSR produz bandas mais confiáveis e reprodutíveis quando comparado ao outro marcador, também dominante, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), devido a temperatura de anelamento e acesso a maior quantidade de sequências (Yang *et al.*, 2011), além de ter menor custo e possibilitar análises com maior rapidez e eficiência.

Neste estudo foram utilizados marcadores ISSR com o objetivo de inferir sobre a diversidade genética das populações de *R. canadum* ao longo da costa do Brasil e nos locais onde estão sendo cultivados com interesse na produção aquícola.

Material e Métodos

Amostras

As amostras de tecidos de *R. canadum* foram obtidas de 155 exemplares procedentes de diferentes localidades brasileiras, divididas em populações nativas, provenientes dos estados do Piauí (PI), Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB) e Bahia (BA) e cultivadas, dos estados de Pernambuco (PE), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) e Bahia (BA) (Tabela 1). O tecido obtido da região da nadadeira foi conservado em Etanol 96% e armazenado sob refrigeração.

Tabela 1. Indivíduos da espécie *Rachycentron canadum* coletados em diferentes estados brasileiros.

Local	Sigla	Nº de indivíduos
População Natural	---	---
Piauí	PI	20
Ceará	CE	20
Rio Grande do Norte	RN	17
Paraíba	PB	14
Bahia	BA	20
População Cultivo	---	---
Pernambuco	PE	13
Rio de Janeiro	RJ	13
São Paulo	SP	20
Bahia	BA	18
Total		155

Extração de DNA genômico

As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Fenol-Clorofórmio descrito por Sambroock *et al.* (1989). Após extração, os DNAs foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose concentrado a 1%, 3 µL do corante azul de bromofenol a fim de possibilitar a visualização no gel e 1,5 µL de brometo de etídio que tem como objetivo de verificar a integridade e quantificar

o material genético. Os géis foram registrados por meio do sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Amplificação ISSR-PCR

Um total de doze *primers* ISSR (Tabela 2) foram testados nas amostras de DNA da espécie *R. canadum*, sendo nove selecionados por apresentarem boa amplificação. A mistura de reação em cadeia de polimerase teve como componentes os seguintes reagentes, totalizando 25 µL da mistura de reação final: 2 – 5 ng DNA, 2,5 µL de solução tampão (10x), 2,5 µL MgCl₂ (50 mM), 5 µL dNTPs (100 mM), 2,5 µL de primer (50 µM) e 1,5 U Taq Dna Polimerase. As amplificações de PCR foram conduzidas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) e consistiram numa etapa inicial de desnaturação do DNA a 94 °C por 1 minuto; seguido por 39 ciclos, cada um apresentando 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 1 minuto para o pareamento do iniciador a temperatura específica de cada *primer* (Tabela 2); 1 minuto de extensão do fragmento do DNA a 72 °C; seguido de uma extensão final por 7 minutos; e 14 °C.

Tabela 2. *Primers* utilizados para a amplificação de DNA da espécie *Rachycentron canadum*.

Nome dos <i>primers</i>	Sequência 5' – 3'	Temperatura de anelamento (°C)
ISSR 1	(AG) 8YC	52,8
ISSR 2	(AG)8YA	54,0
ISSR 3	(GA)8YT	52,8
ISSR 4	(GA)8YC	52,8
ISSR 5	(GA)8YG	54,0
ISSR 6	(CT)8RA	50,0
ISSR 7	(GGAC)3A	51,0
ISSR 8	(GGCA)3C	51,0
ISSR 9	(GGAC)4	51,0
ISSR 10	(GA)8C	52,8
ISSR 11	(CT)8G	52,0
ISSR 12	(AACC)4	51,0

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, submetido por 4 horas a 70 volts contendo solução tampão TBE diluído 10x e o gel corado com 2 µL brometo de etídio. Os poços foram preenchidos com 20 µL da reação após PCR, acrescido de 3 µL de corante azul de bromofenol. Em cada gel foi utilizado o marcador DNA Ladder 100bp como padrão molecular para auxiliar a estabelecer o tamanho das bandas. Em seguida os géis eram fotodocumentados em transluminador sob luz ultravioleta do sistema de fotodocumentação L-PIX Loccus Biotecnologia.

Análise estatística dos dados

As bandas reprodutíveis do marcador dominante ISSR foram avaliadas como ausentes (0) ou presentes (1) para cada um dos genótipos avaliados. Calculou-se o número total de bandas amplificadas e o número de bandas polimórficas, com os nove primers selecionados para a análise. A matriz de dados de presença/ausência resultante foi analisada utilizando o programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1997) para estimar o nível de diversidade genética.

A análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada pelo pacote ARLEQUIN 3.01, para avaliar a variação significativa entre e dentro das populações de *R. canadum*.

Foram obtidos os seguintes parâmetros de diversidade genética dentro e entre as populações, incluindo percentagem de bandas polimórficas (PPB), índice de Shannon (I), e diversidade de gene de Nei (H).

A Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) foram inferidas pelo programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1997). Para analisar a relação genética, a distância genética de Nei (1972) também foi gerada pelo o programa POPGENE. O dendrograma foi construído a partir da distância genética de Nei (1978) com o método par a par de médias ponderadas (UPGMA), com 1000 permutações de *bootstrapping* utilizando MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

Resultados

Reação ISSR-PCR

Os nove iniciadores escolhidos geraram um número total de 114 fragmentos polimórficos sem ter sido detectado nenhum fragmento monomórfico, com tamanho de pares de base variando entre 300 e 2072 pb, conforme a Tabela 3 e as Figuras 1, 2 e 3. Os fragmentos que possuíam o mesmo peso molecular foram considerados como pertencentes ao mesmo loco. O número total de *loci* variou de acordo com os iniciadores, sendo o maior número de *loci* produzidos pelo ISSR 1 e o menor pelo ISSR 6.

Tabela 3. *Primers* ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre as diferentes populações da espécie *Rachycentron canadum* e suas características moleculares.

Iniciadores ISSR	Sequência 5' - 3'	Ta*	Tamanho estimado das bandas* (pb)	Nº de <i>loci</i> polimórficos
ISSR 1	(AG) 8YC	52,8° C	300 - 1500	15
ISSR 2	(AG)8YA	54,0° C	300 - 1800	13
ISSR 3	(GA)8YT	52,8° C	150 - 1200	14
ISSR 4	(GA)8YC	52,8° C	200 - 1500	16
ISSR 5	(GA)8YG	54,0° C	300 - 1400	14
ISSR 6	(CT)8RA	50,0° C	800 - 2072	7
ISSR 7	(GGAC)3A	51,0° C	400 - 2072	13
ISSR 8	(GGCA)3C	51,0° C	400 - 1800	13
ISSR 9	(GGAC)4	51,0° C	400 - 2072	9
Total				144

*ta=temperatura de anelamento

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose utilizando o *primer* ISSR 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações naturais do Piauí (numerados de 1 a 20), Ceará (numerados de 1 a 20) e Rio Grande do Norte (numerados de 1 a 16). M = Marcador *Ladder* 100pb. As setas indicam a presença do fragmento com 1200 pb.

Fonte: arquivo pessoal.

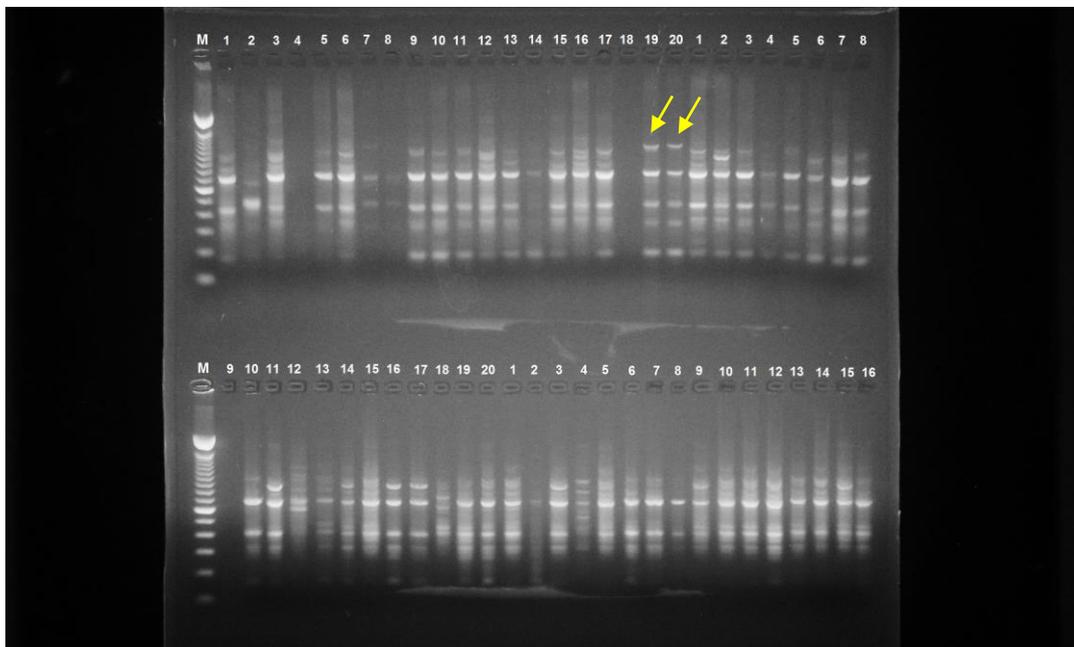


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose utilizando o *primer* ISSR 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações naturais do Rio Grande do Norte (17 e 18), Paraíba (numerados de 1 a 14), Bahia (numerados de 1 a 20) e populações cativas de Pernambuco (numerados de 1 a 13) e Rio de Janeiro (numerados de 1 a 5). M = Marcador *Ladder* 100pb. A seta indica a presença do fragmento 1200 pb.

Fonte: arquivo pessoal

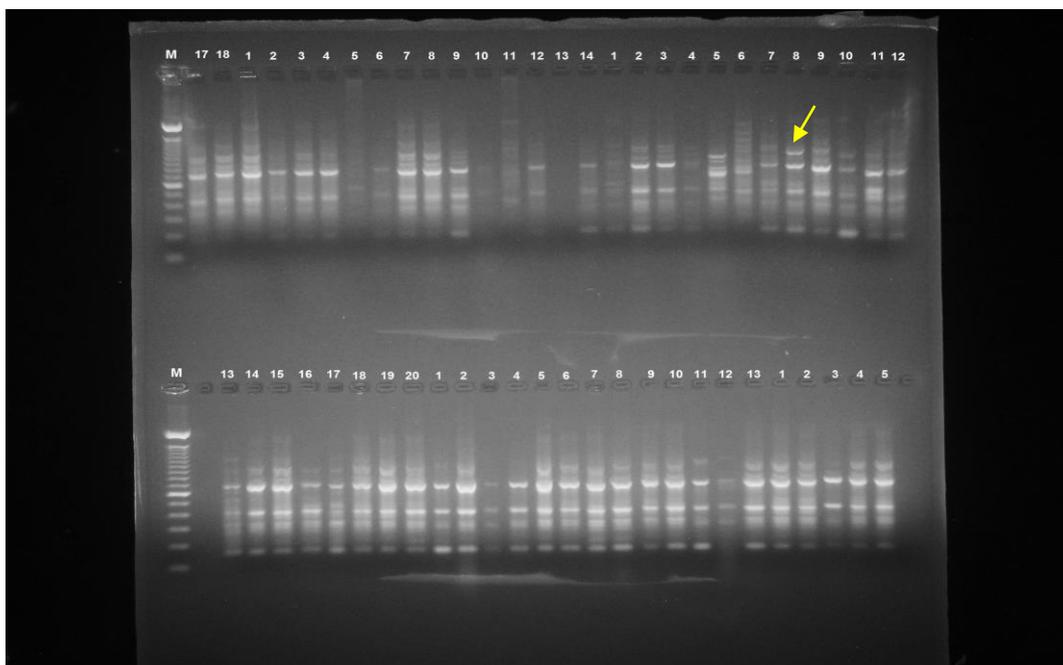
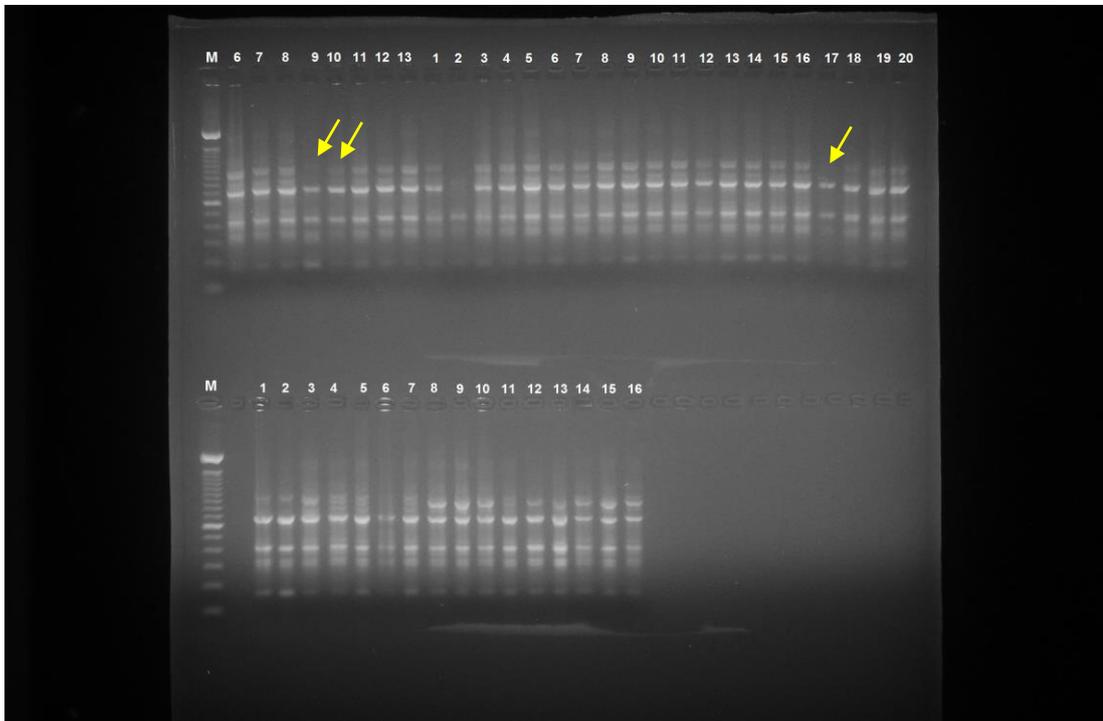


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose utilizando o primer 3 na espécie *Rachycentron canadum* identificado pelas populações cativas do Rio de Janeiro (numerados de 6 a 13), São Paulo (numerados de 1 a 20) e Bahia Pesca (numerados de 1 a 16). M = Marcador Ladder 100 pb. As setas indicam a ausência do fragmento com 1200 pb.

Fonte: arquivo pessoal.



Estrutura populacional e diversidade genética das populações

Populações Naturais

Os resultados encontrados para as populações naturais (PI, CE, RN, PB e BA) mostraram que as medidas para a comparação de identidade genética de Nei (1972) variaram de 0,7990 a 0,9384 e as medidas para comparação de distância genética variaram de 0,0636 a 0,2244 (Tabela 4). O valor máximo estimado (0,9384) da identidade genética de Nei ocorreu entre as populações do Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE), e o valor mínimo estimado (0,7990) entre as populações da Paraíba (PB) e Bahia (BA). Em contrapartida, o valor máximo observado (0,2244) da distância genética está entre as populações da Bahia (BA) e Paraíba (PB) e o valor mínimo observado (0,0636) entre as populações do Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE).

Tabela 4. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira.

População	PI	CE	RN	BA	PB
PI	-----	0,9365	0,9101	0,8294	0,9141
CE	0,0656	-----	0,9384	0,8318	0,9247
RN	0,0942	0,0636	-----	0,8401	0,8743
BA	0,1870	0,1842	0,1742	-----	0,7990
PB	0,0898	0,0783	0,1343	0,2244	-----

Conforme a Tabela 5, quando analisados os dados para o índice de Shannon (I) a diversidade genotípica variou entre as populações de 0,1893 ($\sigma \pm 0,2696$) na Paraíba a 0,3654 ($\sigma \pm 0,2691$) na Bahia. A respeito do número de alelos observados, houve variação de 1,3663 ($\sigma \pm 0,4842$) a 1,7807 ($\sigma \pm 0,4156$). Quanto ao número de alelos efetivos, os valores ficaram entre 1,2161 ($\sigma \pm 0,3422$) e 1,4141 ($\sigma \pm 0,3781$). A média de diversidade genética de Nei (H) teve variação entre 0,1262 ($\sigma \pm 0,1867$) e 0,2418 ($\sigma \pm 0,1953$).

A média da diversidade genética total (H_T) para todas as populações foi de 0,2261 ($\sigma \pm 0,0381$) e a média de diversidade esperada 0,1865 ($\sigma \pm 0,0192$). A diferenciação genética estimada pela média G_{ST} resultou em 0,1751 e o número de migrantes nas populações indicado pelo fluxo gênico, resultou em $N_m = 2.3555$ (Tabela 6).

A estruturação da variabilidade genética das populações (Figura 4) apresentou formação de dois principais grupos, sendo o grupo I constituído pelas populações do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, apresentando menor distância genética de acordo com a comparação a pares. No grupo II está apenas a população da Paraíba.

Tabela 5. Diversidade genética das populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira.

Estado	na	ne	H	I	N° de <i>loci</i> polimórficos	Percentual de <i>loci</i> polimórficos
PI	1,5877 ($\sigma \pm 0,4944$)	1,3218 ($\sigma \pm 0,3703$)	0,1888 ($\sigma \pm 0,1988$)	0,2849 ($\sigma \pm 0,2827$)	67	58,77%
CE	1,6228 ($\sigma \pm 0,4868$)	1,3570 ($\sigma \pm 0,3766$)	0,2087 ($\sigma \pm 0,2002$)	0,3135 ($\sigma \pm 0,2837$)	71	62,28%
RN	1,5702 ($\sigma \pm 0,4972$)	1,3055 ($\sigma \pm 0,3577$)	0,1814 ($\sigma \pm 0,1960$)	0,2744 ($\sigma \pm 0,2805$)	65	57,02%
PB	1,3663 ($\sigma \pm 0,4842$)	1,2161 ($\sigma \pm 0,3422$)	0,1262 ($\sigma \pm 0,1867$)	0,1893 ($\sigma \pm 0,2696$)	37	32,46%
BA	1,7807 ($\sigma \pm 0,4156$)	1,4141 ($\sigma \pm 0,3781$)	0,2418 ($\sigma \pm 0,1953$)	0,3654 ($\sigma \pm 0,2691$)	89	78,07%

*na = número de alelos observados

*ne = número efetivo de alelos

*H = diversidade genética de Nei (1972)

*I = índice de informação de Shannon

Tabela 6. Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) para as populações naturais da espécie *Rachycentron canadum* da costa brasileira.

	H_T	H_s	G_{ST}	N_m
População total	0,2261 ($\sigma \pm 0,0381$)	0,1865 ($\sigma \pm 0,0192$)	0,1751	2,3555

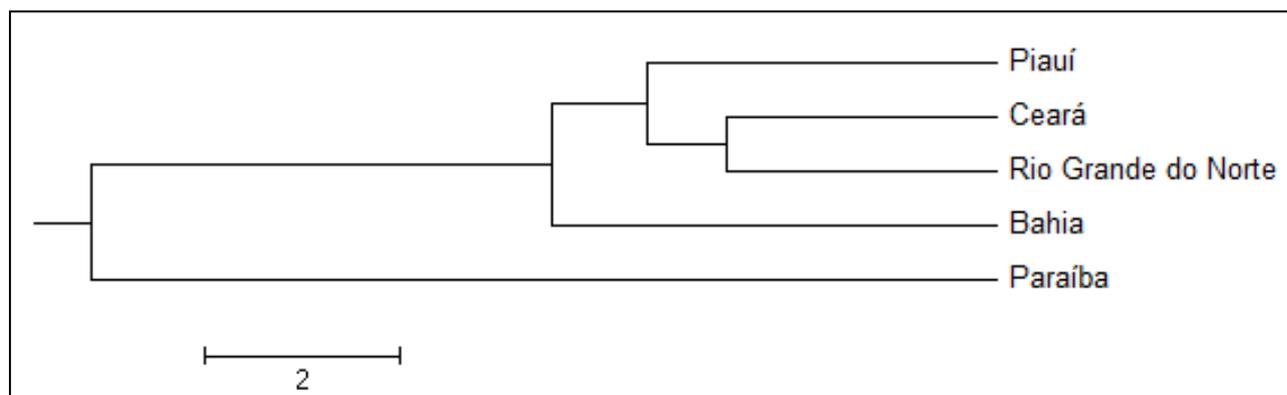
* H_T = diversidade total

* H_s = diversidade esperada

* G_{ST} = diferenciação populacional

* N_m = estimativa do fluxo gênico

Figura 4. Dendrograma formado pelo método UPGMA (Método de ligação média entre grupos) com as populações naturais de *Rachycentron canadum* da costa brasileira com base na distância genética de Nei (Nei, 1972).



Populações Cultivadas

Na Tabela 7, encontram-se os resultados referentes às populações cultivadas (PE, RJ, SP, BP) representando as medidas de comparação de distância genética de Nei (1972). Observa-se que houve uma variação de 0,8853 a 0,9476 para a identidade genética de Nei e as medidas para comparação da distância genética variaram de 0,0538 a 0,1218. O valor máximo estimado (0,9476) da identidade de Nei ficou entre as populações de cultivo da Bahia e São Paulo e o valor mínimo (0,8853) entre São Paulo e Pernambuco. Já a comparação da distância genética teve o seu valor máximo (0,1218) entre as populações cultivadas dos estados de São Paulo e Pernambuco, enquanto o valor mínimo (0,0538) ficou entre as populações de São Paulo e Bahia.

Os resultados na Tabela 8 indicam que o índice de Shannon (I) mostra que a diversidade entre as populações variou de 0,1558 ($\sigma \pm 0,2613$) na população do Rio de Janeiro a 0,2330 ($\sigma \pm 0,2930$) da Bahia. O valor inferido no número de alelos observados encontra-se entre 1,2807 ($\sigma \pm 0,4513$) a 1,4561 ($\sigma \pm 0,5003$) para o Rio de Janeiro e Pernambuco, respectivamente. Para o número de alelos efetivos a população do Rio de Janeiro apresentou 1,1836 ($\sigma \pm 0,3305$) como valor mínimo em comparação a população da Bahia com 1,2833 ($\sigma \pm 0,3944$) que teve a média mais alta. A média de diversidade genética de Nei (H) teve variação entre 0,1054 ($\sigma \pm 0,1809$) e 0,1580 ($\sigma \pm 0,2074$) sendo a menor média para o cultivo do Rio de Janeiro e a maior média para a Bahia. A diversidade genética total (H_T) para todas

as populações foi de 0,1959 ($\sigma \pm 0,0363$) e a diversidade esperada (H_S) de 0,1378 ($\sigma \pm 0,0203$). A diferenciação genética estimada pela média G_{ST} resultou em 0,2966 e o número de migrantes nas populações indicado pelo fluxo gênico, resultou $N_m = 1,1858$ (Tabela 9).

A estruturação da variabilidade genética das populações (Figura 5) apresentou a formação de três principais grupos, sendo o grupo I e II constituído pelas populações cultivadas de Pernambuco e Rio de Janeiro, respectivamente. O grupo III foi formado pelas populações cultivadas de São Paulo e Bahia, que apresentaram menor distância genética.

Tabela 7. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil.

Cultivo	PE	RJ	SP	BA
PE	-----	0,9061	0,8853	0,8899
RJ	0,0987	-----	0,9293	0,9035
SP	0,1218	0,0734	-----	0,9476
BA	0,1166	0,1015	0,0538	-----

Tabela 8. Diversidade genética das populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil.

Cultivo	na	ne	H	I	n° de loci polimórficos	% de loci polimórficos
PE	1,4561 ($\sigma \pm 0,5003$)	1,2419 ($\sigma \pm 0,3423$)	0,1441 ($\sigma \pm 0,1874$)	0,2194 ($\sigma \pm 0,2703$)	52	45,61
RJ	1,2807 ($\sigma \pm 0,4513$)	1,1836 ($\sigma \pm 0,3305$)	0,1054 ($\sigma \pm 0,1809$)	0,1558 ($\sigma \pm 0,2613$)	32	28,07
SP	1,4123 ($\sigma \pm 0,4944$)	1,2509 ($\sigma \pm 0,3665$)	0,1437 ($\sigma \pm 0,1975$)	0,2135 ($\sigma \pm 0,2828$)	47	41,23
BA	1,4474 ($\sigma \pm 0,4994$)	1,2833 ($\sigma \pm 0,3944$)	0,1580 ($\sigma \pm 0,2074$)	0,2330 ($\sigma \pm 0,2930$)	51	44,74

*na = número de alelos observados

*ne = número efetivo de alelos

*H = diversidade genética de Nei (1972)

*I = índice de informação de Shannon

Tabela 9. Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) para as populações cultivadas da espécie *Rachycentron canadum* no Brasil.

	H_T	H_s	G_{ST}	N_m
População total	0,1959 ($\sigma \pm 0,0363$)	0,1378 ($\sigma \pm 0,0203$)	0,2966	1,1858

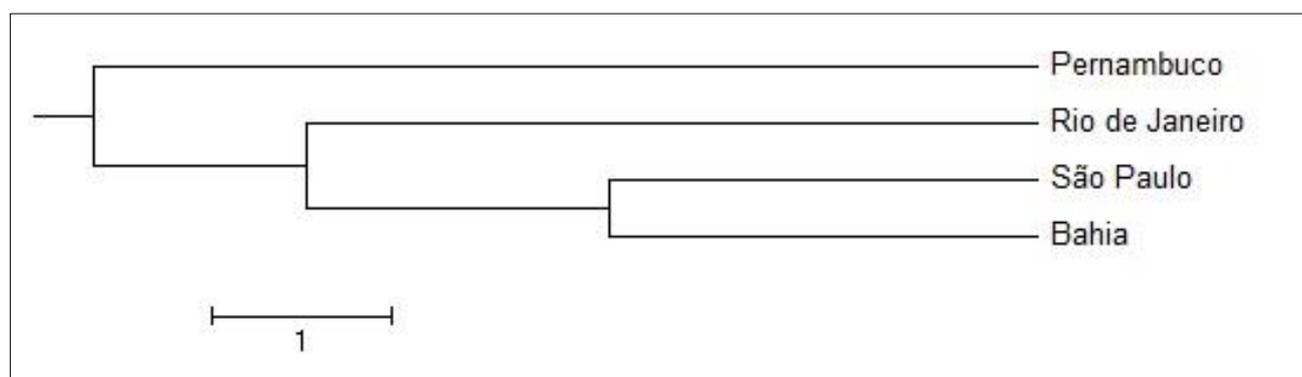
* H_T = diversidade total

* H_s = diversidade esperada

* G_{ST} = diferenciação populacional

* N_m = estimativa do fluxo gênico

Figura 5. Dendrograma formado pelo método UPGMA (Método de ligação média entre grupos) com as populações cultivadas de *Rachycentron canadum* no Brasil com base na distância genética de Nei (Nei, 1972).



Diferenciação populacional

Com base nos resultados da AMOVA e dos índices de fixação (F_{ST}), (Tabela 10) verificou-se diferenciação significativa entre as populações estudadas as quais foram analisadas de uma forma geral. Para a análise de estruturação populacional para Wright (1978), os valores de F_{ST} que se encontram entre 0 e 0,05 configuraram baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15, estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25, estruturação alta e acima de 0,25, forte estruturação genética. A análise de variância molecular ao considerar todas as populações avaliadas, tanto naturais quanto cultivadas formando um único grupo, evidenciou que 61,54% da variação total encontra-se dentro das populações estudadas e 38,46% entre as populações, gerando um índice F_{ST} de 0,38. A AMOVA também foi reali-

zada ao formar dois grupos hierárquicos (entre e dentro das populações naturais e o mesmo contexto para as populações cultivadas). A variância verificada dentro e entre as cinco populações naturais analisadas foi de 80,26% e 19,74%, respectivamente. Para as populações de cultivo, o percentual de variação seguiu o mesmo padrão descrito acima, obtendo assim uma maior variação dentro das populações com 69,87%, do que entre elas com 30,13%.

Tabela 10. Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie *Rachycentron canadum* do Brasil.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de variação	p-valor
Entre populações	8	230,096	1,78041 Va	38,46%	≤ 0,001
Dentro das populações	123	350,336	2,84826 Vb	61,54%	≤ 0,001
Total	131	580,432	4,62867		
Populações naturais					
Entre populações	4	25,287	0,34482 Va	19,74%	≤ 0,001
Dentro das populações	68	95,356	1,40230 Vb	80,26%	≤ 0,001
Total	72	120,644	1,74712		
Populações de cultivo					
Entre populações	3	78,024	1,53425 Va	30,13%	≤ 0,001
Dentro das populações	55	195,671	3,55765 Vb	69,87%	≤ 0,001
Total	58	273,695	5,09191		

*Índice de fixação População total $F_{S7}=0,38465$

*Índice de fixação População natural $F_{S7}=0,19736$

*Índice de fixação População de cultivo $F_{S7}=0,30131$

Discussão

Análise populacional da espécie *Rachycentron canadum* na costa litorânea do Brasil

Um dos principais objetivos, na área da genética de populações é entender as causas da diferenciação das populações ao longo da distribuição temporal e geográfica das espécies (Cruz *et al.*, 2008), que estão passíveis a atuação de ações evolutivas como migração, deriva genética, processos de mutação, efeito fundador, forças adaptativas, dentre outros que possam modificar ao longo dos anos a sua estrutura genética.

Neste trabalho, marcadores moleculares ISSR foram aplicados com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre as populações naturais da espécie *R. canadum* que estão presentes em toda costa do litoral brasileiro. Neste contexto a utilização do marcador ISSR se mostrou eficiente ao fornecer informações que corroboram com estudos genéticos-populacionais, realizados para a espécie em diferentes locais onde ela pode ser encontrada revelando níveis moderados a altos de diversidade genética, como demonstrado por Phinchongsakuldit *et al.* (2013).

Um denominador comum da maioria dos estudos de genética de organismos marinhos são os baixos níveis de diferenciação entre as populações (Knutsen *et al.*, 2011), no qual diversos fatores podem influenciar esse fato e entre eles o mais comum é atribuí-lo ao fluxo gênico, onde nos oceanos é muito maior do que nos ambientes terrestres ou de água doce (Ward *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos demonstram que o valor máximo (0,2244) encontrado para a comparação da distância genética foi entre as populações dos estados da Bahia e Paraíba. Isso pode ser atribuído à localização das duas populações, haja vista que elas estão mais distantes geograficamente. Em contraposto, o valor mínimo (0,0636) se deu entre as populações do Rio Grande do Norte e Ceará, possivelmente pela proximidade geográfica desses estados. A provável eficiência de dispersão das larvas entre as populações é compatível com as estimativas da distância genética de Nei que evidenciaram moderada diferenciação entre as populações, com uma média de 0,12956 (~13%).

O estudo genético referente ao bijupirá ainda é incipiente principalmente quando relacionado ao tipo de marcador molecular utilizado, no qual os mais empregados são os microssatélites. Os níveis de diversidade genética esperada ($H_s=0,1865$), com base na distância de Nei, na espécie *R. canadum*, mostram que o valor obtido neste trabalho foi equivalente aos níveis de diversidade populacional, quando comparado ao resultado de diversidade haplotípica encontrado em populações na costa do Brasil por Nepomuceno *et al.* (2014), que foi de $h=0,1836$.

Quando voltada para o estudo de populações naturais a constituição genética dos indivíduos que a compõe auxiliam na descoberta da sua dinâmica populacional e a forma como se comportam ao longo da sua distribuição espacial e geográfica, permitindo ajudar na determinação e preservação do seu habitat como um todo e também locais específicos utilizados para reprodução e recrutamento, por exemplo. Contudo, Cruz *et al.* (2008) afirmam que a conservação dos recursos genéticos tanto de espécies vegetais e animais tem grande relevância em função da quantidade de estudos realizados para quantificar a diversidade genética e entendimento de sua magnitude, natureza e distribuição entre e dentro das populações, na qual qualquer programa de melhoramento ou a própria conservação desses recursos está diretamente dependente do conhecimento que advém da quantificação da variação presente na espécie de interesse.

De acordo com o dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio das médias de distância de Nei, a população da Bahia apresentou maior diversidade ($H=0,2418$) e quantidade de alelos ($n_a=1,7807$) quando comparadas aos outros estados, sendo assim, é possível que ela compartilhe alelos com todas as outras populações dos estados do Piauí, Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba. Diante disto encontra-se mais similar geneticamente dessas populações, apesar da distância geográfica que as separam. Este resultado está de acordo com Nepomuceno *et al.* (2014), que num estudo de filogeografia realizado com o bijupirá também da costa brasileira encontrou, através de suas análises, que dentre as populações selvagens dos estados do Piauí, Bahia e Ceará, os peixes coletados na Bahia eram os mais distintos entre os demais.

A proporção da diversidade genética entre as populações (G_{ST}) foi de 0,1751, indicando que a variabilidade entre e dentro das populações contribuiu com 17,5% e 82,4% da diferenciação total, respectivamente. O fluxo alélico (N_m),

estimado com base nos valores de G_{ST} foi de 2,355. Este resultado é condizente com a moderada diferenciação genética entre as populações havendo um número de 2,3 migrantes por geração, no qual teoricamente, um fluxo gênico maior que quatro migrantes é suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética (Slatkin, 1987).

Segundo Phinchongsakuldit *et al.* (2013), geralmente a constatação de um alto fluxo gênico entre populações pode ser explicada tanto por indivíduos adultos que migram ao longo de grandes distâncias para se reproduzir com outros grupos ou por indivíduos adultos que se reproduzem com grupos próximos mas têm suas larvas e juvenis à deriva destinados a locais distantes sob a influência de correntes oceânicas. No ambiente marinho as características oceanográficas, como correntes, podem influenciar a dispersão de ovos, larvas, juvenis e peixes adultos, moldando assim a subestruturação populacional (Henriques *et al.*, 2014). O fluxo gênico se encaixa nesse contexto, quando por sua definição, ele é a movimentação de genes entre populações, ou seja, todos os movimentos ocorrentes de gametas a indivíduos que realizam a troca de genes ao longo da sua distribuição espacial (Nigel, 1997). No Brasil a presença das três principais correntes marítimas

Quando voltado para o estudo de populações naturais a constituição genética dos indivíduos que a compõe, auxiliam na descoberta da sua dinâmica populacional e a forma como se comportam ao longo da sua distribuição geográfica, que podem, por exemplo, ajudar na determinação e preservação de locais utilizados para reprodução. A potencialidade de utilização dos recursos biológicos pode ser observada e manejada por meio dos recursos genéticos, os quais possuem valor econômico agregado presente nos genes (Querol, 1993). Tendo em vista que o bijupirá é um peixe de grande interesse comercial, principalmente para o setor da aquicultura, o conhecimento a respeito da espécie é crucial para estabelecer o seu uso de forma sustentável e garantir a sua posterioridade.

Variabilidade genética dos estoques de bijupirá cultivados em diferentes estados do Brasil

A variabilidade genética é uma importante característica de espécies que estão em processo de domesticação, uma vez que aquelas com níveis mais ele-

vados de diferenciação são mais propensas a apresentar atributos genéticos para características produtivas (Alarcón *et al.*, 2004).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados com maior frequência e de forma eficiente para que se possa avaliar os níveis de variabilidade genética por indivíduos ou entre as populações que compõe os estoques de peixes na piscicultura com o objetivo de aprimorar o setor e contribuir ainda mais para o seu desenvolvimento. Dentro desse contexto, o marcador molecular do tipo *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR, demonstra que sua utilização é realizada com sucesso na avaliação dos níveis de diversidade genética nos peixes mantidos em sistemas de cultivo, pois se torna possível obter o perfil genético dos indivíduos estudados.

Por meio da identidade genética de Nei foi observado que os estoques da Bahia e São Paulo apresentaram a maior similaridade genética (0,9476). Esse resultado já era esperado, pois parte dos peixes que formam o cultivo experimental da Bahia Pesca (BA), localizada na região de Ituberá onde as amostras das nadadeiras foram coletadas, foram obtidos através de uma empresa que mantém os bijupirás em cativeiro em São Paulo.

Os estoques mais distantes estão entre São Paulo e Pernambuco com o valor de 0,8853, porém essa distância não difere tanto das demais quando analisadas. As duas informações corroboram com a similaridade genética existente nas próprias populações naturais da espécie, onde não são encontrados níveis muito altos de estruturação genética.

Em pesquisas visando caracterizar o perfil genético das populações de peixes na piscicultura, foram encontrados níveis baixos de diferenciação estimados a partir do índice Shannon, a exemplo da análise em espécies cultivadas como *Cynoglossus semilaevis* ($I = 0,1089$) (Liu *et al.*, 2009), *Monopterus albus* ($I = 0,2822$) (Li *et al.*, 2013) e *Piaractus mesopotamicus* ($I = 0,289$) (Povh *et al.*, 2008). A partir desses resultados, ao compará-los com os autores citados anteriormente, pode-se afirmar que os valores de (I) (Tabela 8) para as populações cultivadas do bijupirá, que variaram entre 0,1558 e 0,2330, demonstram ser equivalentes à variabilidade genética existente dentro das populações que estão sendo mantidas nesses cultivos.

Ao contrário do que foi encontrado em outras pisciculturas, Barrero *et al.* (2008) obtiveram valores de (I) = 0,47 para estoques da espécie *Prochilodus lineatus*, em que ele afirma existir maior diferenciação genética com base no índice

de Shannon. Este índice tem sido favorável na análise de dados de marcadores moleculares tipo RAPD devido a sua aparente insensibilidade às tendências que poderiam ser introduzidas pela impossibilidade de detecção de indivíduos heterozigotos (Rodrigues e Molina, 2007), entretanto este mesmo pensamento pode ser direcionado aos marcadores ISSR já que eles compartilham do mesmo caráter dominante.

As populações apresentaram porcentagem de *loci* polimórfico de 28,07%, para o estoque do Rio de Janeiro, 41,23% para São Paulo, 44,74% para a Bahia e 45,61% para o estoque de Pernambuco. Portanto, existe uma menor variabilidade genética para os peixes cultivados do Rio de Janeiro em relação aos demais, estando equivalente ao resultado adquirido através do índice de Shannon. O estoque cativo de Pernambuco se mostrou com maior nível de polimorfismo e conseqüentemente mais diferenciada, corroborando esse resultado ao mesmo obtido por Benevides *et al.* (2013), no qual afirmam que Pernambuco se mostra como uma população estruturada.

A variabilidade genética pode ser explicada a partir da forma de como essas populações foram constituídas, principalmente quanto a manejo direcionado aos reprodutores. Dessa maneira, uma vez que os reprodutores tenham baixa variabilidade genética, esta será mantida ao longo do tempo, caso não haja introdução de novos genótipos na população (Viera *et al.*, 2005).

Conforme a construção do dendrograma observa-se a formação de três agrupamentos, no qual os indivíduos que compõe o cultivo de Pernambuco e Rio de Janeiro se agregaram de forma isolada, formando o grupo I e II, respectivamente. Já as populações de São Paulo e da Bahia formaram o grupo III. A união dos indivíduos que estão no grupo III pode ser explicada devido a constituição do cultivo a partir da origem dos peixes que o compõe. O cultivo experimental onde as amostras foram coletadas identificadas como Bahia é composto também por peixes enviados da extinta empresa TWB de São Paulo. Contudo, a similaridade genética existente entre essas duas populações (SP e BA) está de acordo com as informações a respeito das amostras utilizadas nesse estudo.

A perda da variabilidade genética eventualmente pode ocorrer já após a produção da primeira geração, o que resultaria numa diminuição da diversidade genética e levar a um declínio geral do “vigor” das populações remanescentes (Liu *et al.*, 2006). Porém, tal característica deve ser avaliada considerando tam-

bém a variabilidade existente nos indivíduos que deram origem, ou seja, os reprodutores obtidos no ambiente natural, às sucessivas gerações mantidas na piscicultura, tendo em vista que a baixa diferenciação espécie-específica já seja estabelecida com uma característica filogeográfica apresentada pela espécie e necessite de um programa voltado ao melhoramento genético para que esse problema não se agrave ao gerar maiores níveis de endogamia.

Astolphi (2003) afirma que a existência da variabilidade genética em populações sujeitas à seleção é um quesito primordial para programas de melhoramento. Entretanto, o sucesso em elevar os níveis de dissimilaridade genética não depende somente da variabilidade existente entre os reprodutores e sim associá-la a uma quantidade relevante de matrizes que possam participar da seleção. Segundo Povh *et al.* (2008), a endogamia, a utilização de um pequeno número de matrizes e a seleção não intencional durante a reprodução se tornam os principais fatores do manejo reprodutivo que promovem o aumento da similaridade genética nos sistemas de cultivo.

Diante dessa afirmação é possível dizer que aumentar os níveis de variabilidade genética dentro das populações que estão sendo cultivadas com o interesse de aumentar o potencial produtivo da espécie em evidência é de extrema importância para o progresso nos sistemas de melhoramento genético.

Diversidade genética comparativa entre populações nativas e cativas de bijupirá pertencentes ao litoral brasileiro

Ao considerar a diversidade biológica dos peixes, tendo como destaque nesse estudo o bijupirá, a importância da conservação do mesmo e a atividade aquícola acerca da pesca e aquicultura, os recursos genéticos animais estão passíveis de terem o seu manejo auxiliado por via da utilização dos marcadores genéticos moleculares. Os esforços científicos referentes aos possíveis benefícios gerados a partir da junção da genética e aquicultura já ocorrem a alguns anos e vêm promovendo o aumento da variabilidade nos estoques de cultivo e conseqüentemente o melhoramento genético das espécies.

Neste estudo o marcador molecular ISSR foi utilizado com a intenção de acessar a variabilidade genética entre as populações nativas e cativas de bijupirá, além de inferir sobre a diferenciação dessas populações de forma independente.

Os resultados obtidos mostraram, por meio dos coeficientes de polimorfismos, que os indivíduos selvagens apresentaram níveis maiores de *loci* polimórficos quando comparado com os indivíduos cultivados com 57,72% e 39,91%, respectivamente.

Li *et al.* (2013) e Liu *et al.* (2006) também encontraram níveis semelhantes de polimorfismo com o marcador ISSR ao comparar populações selvagens e cultivadas de *Monopterus albus* e *Paralichthys olivaceus*, que chegaram a 67,3%-56,17% e 33,92%-27,45%, respectivamente.

Ao observar a diferenciação interpoblacional no bijupirá, a variação média dos parâmetros da diversidade genética de Nei e índice de Shannon seguiram os mesmos padrões de polimorfismo ao revelar $H=0,1894$ e $I=0,2855$ para as populações selvagens e $H=0,1378$ e $I=0,2054$ para as populações cultivadas, havendo maior dissimilaridade entre os indivíduos capturados na natureza.

A análise de variância molecular revelou que existe maior diferença dentro (61,54%) das populações de bijupirá do que entre elas (38,46%). A AMOVA corrobora com os resultados obtidos por Li *et al.* (2013) e Povh *et al.* (2008), que também encontraram a maior parte da variação dentro de cada grupo (69,59% e 84,2%) e não entre os grupos (30,41% e 15,8%), respectivamente, na comparação de espécies de peixes utilizados na aquicultura e provenientes do ambiente natural. No entanto o F_{ST} demonstra que ambos os grupos hierárquicos formados (nativos e cativos) apresentam de moderada (0,19) a alta (0,30) estruturação genética de acordo com Wright (1978). Phinchongsakuldit *et al.* (2013) chegaram a mesma conclusão ao analisar as populações naturais da espécie *Rachycenton canadum* localizadas no Golfo da Tailândia e mar de Andaman quando estabelecido os parâmetros de F_{ST} . Os índices de fixação F_{ST} gerados pela amova correspondem ao G_{ST} por produzirem valores próximos e que com base no fundamento teórico um seria complementar ao outro.

Como os indivíduos de cultivo selecionados tendem a ser menos diversificados geneticamente, quando comparados às populações selvagens, é relevante monitorar a composição genética das futuras e atuais gerações por meio de marcadores moleculares e compará-las com a populações naturais (Lv *et al.*, 2012). A afirmação do autor supracitado coincide com os valores gerados pela AMOVA a respeito da diversidade dentre os peixes que compõe ambos os grupos com 80,26% e 69,87% da variação dentro das populações naturais e cultivadas, res-

pectivamente. Esse comportamento, de acordo com Chen *et al.* (2009) pode ser atribuído na aquicultura ao número ou tamanho da população fundadora (matrizes) que dá origem as futuras gerações cultivadas. Na área genética este acontecimento, conhecido como efeito fundador, é bem comum em sistemas de cultivo de peixes, seja ele voltado para o setor produtivo ou relacionados às atividades em programas de repovoamento, mais focados em estratégias de conservação. Situação semelhante, evidenciando níveis mais baixos de diversidade genética em populações de peixes cativas em relação às nativas na espécie *Trachidermus fasciatus* no trabalho realizado por Xiaoxiao *et al.* (2011), em que os autores associaram este fato à possibilidade de deriva genética, depressão endogâmica e seleção de matrizes.

Quando avaliado em grandes proporções a aquicultura, apesar de todos os benefícios, também pode oferecer riscos de impacto às populações naturais ao liberar acidentalmente peixes cultivados no ambiente aquático, seja por descuido no manejo de tanques-redes, gaiolas e viveiros ou por danificação eventual de estruturas utilizadas no cultivo.

A consanguinidade dos indivíduos utilizados no processo reprodutivo na aquicultura leva a erosão genética, tornando-os mais aparentados e como consequência eleva a homozigose, promovendo a endogamia ao passar dos anos resultando na limitação do potencial genético da espécie (Oliveira, 2014).

Segundo Nguyen (2009), devido a produção promissora do bijupirá, a partir do desenvolvimento em massa do cultivo em Taiwan, os alevinos produzidos no local foram distribuídos para uma série de outros países incluindo Japão, Indonésia, Vietnã, Malásia, Singapura, China, Filipinas e inclusive em lugares, a exemplo do Norte de Bali, onde previamente não eram vistos por pescadores locais. Quanto ao Norte de Bali, o referido autor atribui o motivo pelo qual os pescadores não estariam familiarizados com a espécie, até a instalação de gaiolas para produzi-los no local, devido ao fato de que os indivíduos (nativos) formariam pequenas agregações, característica comportamental da própria espécie, ou por serem consideradas como espécie introduzida. Esse tipo de informação é crucial para o desenvolvimento de políticas sobre a gestão dos recursos genéticos, de forma que o impacto gerado por meio da introdução de peixes de fenótipos geneticamente adaptados ao seu local de origem, possa sofrer ao serem remanejados para outros locais, além de interferir na constituição genética das populações nativas em

caso de liberação ou fuga desses indivíduos, conseqüentemente influenciando na conservação da espécie.

As informações sobre os níveis de variabilidade genética são essenciais para o uso sustentável e conservação dos recursos genéticos naturais, pois a falta deste conhecimento gerariam implicações que por sua vez podem comprometer de forma negativa os objetivos dos programas de melhoramento genético voltado para produção. Promover o monitoramento das populações cultivadas é de extrema relevância para que estas estejam sempre equivalentes quando comparadas às populações naturais sob o aspecto da diversidade genética e sejam capazes de manter o potencial genético da espécie nas sucessivas gerações. Este trabalho contribuiu de forma significativa na avaliação genética existente para as populações da espécie *R. canadum* presente tanto na costa do Brasil, quanto em sistemas aquícolas, que será útil para a compreensão do melhoramento genético animal e uma melhor concepção da gestão desses recursos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos colaboradores Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres, MSc. Emilly Anny Benevides, Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira, MSc. José Luiz Sanches Júnior e a Prof^a. Dr^a. Lurdes Foresti de Almeida Toledo pelo auxílio na realização deste trabalho.

Literatura citada

ABADIO, A. K. R.; LIMA, S. S.; SANTANA, M. F.; SALOMÃO, T. M. F.; SARTORATO, A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Genetic diversity analysis of isolate of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1272-1279, 2012.

ALARCÓN, J. A.; MAGOULAS, A.; GEORGAKOPOULOS, T.; ZOUROS, E.; ALVAREZ, M. C. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 230, p. 65-80, 2004.

ASTOLPHI, J. L. L. **Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada com uso do marcador RAPD**. 2003. 24 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal-Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

BARRERO LOPERA, N. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; BOSO, K. M. O.; GUALDA, T. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, v. 24, p. 86-93, 2008.

BENETTI, D. D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUM, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, v. 302, p. 195-201, 2010.

BENEVIDES, E. A.; COIMBRA, M. R. M.; TORRES, R. A. Diversidade e estrutura genética do beijupirá (*Rachycentron canadum*; Perciformes: Rachycentridae) em populações cativas e nativas. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 3., 2013, Jequié – BA. **Anais...Jequié**, BA, 2013.

BENEVIDES, E. A.; VALLINOTO, M. N. S.; FETTER FILHO, A. F. H.; SOUZA, J. R. B. de; SILVA-OLIVEIRA, G.; FREITAS, M. O.; FERREIRA, B. P.; HOSTIM-SILVA, M.; BERTONCINI, A. A.; BLANCHARD, F.; TORRES, R. A. When physical oceanography meets population genetics: the case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the Species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 255-266, 2014.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 155-164, 2011.

CHEN, Q.; WANG, C-H.; LU, G.; SONG, X.; XU, J-W.; YANG, Q-L.; LI, S-F. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 549-555, 2009.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1. ed. Viçosa: UFV, Viçosa, 2008, 581 p.

DOMINGOS, T. J.; MORAES, L. N.; MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; VENERE, P. C.; 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**, v. 13, n. 3, p. 7979-7991, 2014.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **A global assessment of offshore mariculture potential from a spatial perspective**, Roma, 2013.

GASMI, S.; FERVAL, M.; PELISSIER, C.; D'AMICO, F.; MARIS, T.; TACKX, M.; LEGAL, L. Genetic diversity among the *Eurytemora affinis* species complex in the Scheldt estuary and its tributaries using ISSR-PCR marker assay. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 145, p. 22-30, 2014.

HENRIQUES, R.; POTTS, W. M.; SANTOS, C. V.; SAUER, W. H. H.; SHAW, P. W. Population connectivity and phylogeography of a Coastal Fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current Region: Evidence of an ancient variant event. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-11, fev., 2014.

HUANG, C-T.; MIAO, S.; NAN, F-H.; JUNG, S-M. Study on regional production and economy of cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture. **Aquaculture International**, v. 19, p. 649-664, 2011.

KNUTSEN, H.; OLSEN, E. M.; JORDE, P. E.; ESPELAND, S. H.; ANDRÉ, C.; STENSETH, N. C. Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes 'biologically meaningful'? A case study of coastal Atlantic cod. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 768-783, 2011.

LI, W.; SUN, W-X.; FAN, J.; ZHANG, C-C. Genetic diversity of wild and cultured swamp eel (*Monopterus albus*) populations from central China revealed by ISSR markers. **Biologia**, v. 68, n. 4, p. 727-732, 2013.

LV, Y-P.; HU, Z-H.; YANG, X-Q.; WANG, C-H. Analysis of genetic variation in selected generations of "Whole Red" pattern *Cyprinus carpio* var. color using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 243-249, 2012.

LIU, Y-G.; CHEN, S-L.; LI, J.; LI, B-B. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. **Aquaculture**, v. 255, p. 565-572, 2006.

LIU, Y-G.; YU, Z-G.; BAO, B-L.; SUN, X-Q.; SHI, Q-L.; LIU, L-X. Population genetics studies of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 821-827, 2009.

MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2008.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NEPOMUCENO, A. R.; FARIA, D. A. de.; CAVALCANTI, L. C. G.; BIAZIO, G. R. de.; SILVA, M. N. A. de.; SANCHES, E. G.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; BRAVO, I. A. F.; FOGAÇA, F. H. S.; McMANUS, C.; CAETANO, A. R.; PAIVA, S. L. Análise filogeográfica de populações selvagens e em cativeiro do bijupirá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 3., 2014, Santos – SP. **Anais...Santos**, SP, 2014.

NIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematic**, v. 28, p. 105-128, 1997.

NGUYEN, T. T. T.; BRIAN DAVY, F.; RIMMER, M. A.; DE SILVA, S. S. Use and exchange of genetic resources of emerging species for aquaculture and other purposes. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 260-274, 2009.

OLIVERA, D. J. **Reprodução em cativeiro de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* assistida por marcador molecular como estratégia de conservação**. 2014. 51 f. Dissertação (Ciências Biológicas: Zoologia) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu – São Paulo.

PHINCHONGSAKULDIT, J.; CHAIPAKADEE, P.; COLLINS, J. F.; JAROENSUTASINEE, M.; BROOKFIELD, J. F. Y. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. **Aquaculture International**, v.21, p. 197-217, 2013.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. da. Diversidade genética do pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 201-206, fev., 2008.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem técnica e socioeconômica**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993, 206 p.

RODRIGUES, M. C.; MOLINA, W. F. Análise genética em *Abudefduf saxatilis* (Perciformes, Pomacentridae) no litoral Nordeste do Brasil e arquipélago São Pedro e São Paulo. **PublCa**, v. 3, p. 28-36, 2007.

SAMBROOCK, J. F.; RITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2° ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory **Press**, 1989.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, 1987.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pieces: Rachycentridae)**. FAO Fisheries Synopsis, 153, U.S. Dep. Commer., NOAA Technical Report NMFS 82, p.21, 1989.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.06. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VIEIRA, V. P.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M.; POVH, J. A.; BARRERO, N. M. L. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de tilápia do

Nilo (*Oreochromis niloticus*) com uso do marcador RAPD. **Revista Acadêmica de Curitiba**, v. 3, m. 3, p. 41-49, jul-set, 2005.

WARD, R. D; WOODMARK, M.; SKIBINSKI, D. O. F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 44, p. 213-232, 1994.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population: variability within and among natural populations**, ed. 4. Chigaco: University of Chicago Press, 1978.

YANG, Q.; GAO, T.; MIAO, Z. Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in Northwestern Pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 286-296, 2011.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belg. J. Bot.**, Brussels, v. 129, p. 157, 1997.

XIAOXIAO, B.; QIAOLI, Y.; TIANXIANG, G. A. O.; CHUANGJU, L. I. The loss of genetic diversity during captive breeding of the endangered sculpin, *Trachidermus fasciatus*, based on ISSR markers: implications for its conservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, n. 5, p. 958-966, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho foi possível construir um banco genético de tecido *ex situ* da espécie *Rachycentron canadum* provenientes de cultivos no Brasil e populações naturais de diferentes estados pertencentes a costa litorânea brasileira.

O marcador molecular do tipo ISSR foi comprovado como ferramenta eficiente no estudo direcionado à diversidade genética e estruturação de populações de peixes, haja vista que a sua confiabilidade também se encontra comprovada através de outros estudos disponíveis na literatura.

A avaliação realizada para as populações selvagens evidenciou que não existe alta diferenciação entre elas, no qual esse comportamento pode ser associado ao fluxo gênico e a dispersão larval, permitindo existir uma conectividade populacional. Na análise das populações cultivadas foi possível inferir que há menor diferenciação genética intrapopulacional, possivelmente relacionada à formação do plantel de reprodutores e manejo seletivo dos mesmos.

Ao comparar a variabilidade genética das populações cativas e nativas brasileiras de bijupirá foi possível verificar que os indivíduos utilizados na aquicultura estão menos diversificados geneticamente do que aqueles capturados na natureza.

Quando analisadas de uma maneira geral, sem separação de origem cativa ou nativa, a maior variação de dissimilaridade genética ocorreu dentro das populações quando comparada a variação entre elas. Diante disso pode-se afirmar que existe de moderada à alta estruturação na composição genética global da espécie.

Com os resultados obtidos sugere-se que estudos posteriores sejam realizados com o objetivo de avaliar a diversidade genética e estrutura

populacional dentro das diferentes populações formadas pela espécie *Rachycentron canadum*, como fonte de informação voltada para medidas efetivas de conservação da biodiversidade e aprimorar os resultados em programas de melhoramento genético e manejo dos indivíduos cultivados no setor aquícola. Para isso recomenda-se utilizar uma maior quantidade de exemplares da espécie, assim como um maior número de *primers* ISSR ou outros tipos de marcadores moleculares e mitocondriais.