



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS E DE CULTIVO  
DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL**

ALCEBÍADES RENATO NEPOMUCENO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Brasília- DF  
Junho de 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS E DE CULTIVO  
DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL**

ALUNO: Alcebiades Renato Nepomuceno

ORIENTADOR: Dr. Renato Caparroz

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Brasília- DF  
Junho de 2017

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

**NEPOMUCENO, A. R. DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS E DE CULTIVO DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL.** Brasília: Faculdade de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília, 2017, 89. Dissertação de Mestrado.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Nepomuceno, Alcebíades Renato

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS E DE CULTIVO DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL.

89 páginas

Dissertação Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Animal.

1- Cobia 2- Diversidade Genética 3- DNA Mitocondrial 4- Microsatélites.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS E DE CULTIVO  
DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL.**

ALCEBÍADES RENATO NEPOMUCENO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Animal como  
parte dos requisitos básicos para obtenção  
do título de Mestre em Biologia Animal.

**APROVADA POR:**

---

**CONCEPTA MARGARET McMANUS PIMENTEL, PhD (UnB)**

**CPF:**                      **E-mail:**

---

**MARIA DE FÁTIMA MENEZES ALMEIDA SANTOS, PhD (UnB)**

**CPF:**                      **E-mail:**

Brasília- DF, junho de 2017

*Dedicatória...*

*"Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.*

*Apenas dê o primeiro passo."*

*Martin Luther King*

Dedico esse trabalho aos amores da minha vida que compartilharam

dessa caminhada:

Aos meus pais, Elias e Irenice, e a minha esposa Lady.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser a fonte da minha força e perseverança, guiando-me, através da fé, em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais, Irenice M<sup>ª</sup> de Jesus Nepomuceno e Elias Vieira Nepomuceno, pela educação dada a mim a qual formulou o meu caráter e princípios, pelos conselhos dados durante essa etapa para poder enfrentar da melhor forma as dificuldades e obstáculos. Sem vocês eu não seria quem sou hoje.

A Lady, meu amor, companheira, amiga, conselheira e ajudante. Sem você esses dias de escrita teriam sido mais difíceis. Obrigado por todo apoio e pela família que formamos: eu, você e nossos sonhos. Poder compartilhar todos os momentos da minha vida com você é muito gratificante. Te amo muito!

A minha irmã, Gleide, pela alegria que passa, até quando está mal humorada. Pelo ombro, conselhos, loucuras, amor e carinho.

A grande família Nepomuceno, que me acolheu, ajudou, aconselhou e tornou meus dias mais felizes nessa reta final: muito obrigado!

Gostaria de agradecer a meu orientador Dr. Renato Caparroz por toda ajuda oferecida, todos os conselhos, ensinamentos e compreensão. É um excelente orientador, assim como pessoa. Meu muito obrigado por contribuir de forma direta nessa etapa tão importante profissionalmente.

Ao Dr. Samuel Rezende Paiva, pela paciência e atenção, pela ajuda e ensinamentos. É um excelente pesquisador e uma ótima pessoa.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, me proporcionando maior conhecimento e maturidade: Dr. Alexandre Caetano, Dra. Connie, Dra. Patrícia Ianella, Dra. Silvia e Gleison.

Aos amigos do laboratório: Bete, Lillian, Naiara e Dra. Luciana e também aos colegas da pós e da Embrapa.

Ao Seu Cícero e Dona Ana, pelos altos papos no corredor na hora do café.

À Universidade de Brasília, a CNPq, MAPA e a CAPES pela bolsa oferecida durante esse período.

*O meu muito obrigado!*

## RESUMO

A aquicultura é uma atividade que vem crescendo de forma acentuada tanto no Brasil como no mundo. Dentre as espécies de peixes marinhos da costa brasileira, o bijupirá (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766), comumente conhecido como cobia, é uma das que mais apresenta potencial para o incremento na produção pesqueira. Tendo ganhado espaço no cenário econômico de vários países e a fim de garantir a comercialização legal e aliviar possíveis conflitos e impactos ao meio ambiente, a caracterização dos perfis genéticos dos peixes de cultivo e de populações selvagens podem reduzir os potenciais impactos genéticos negativos. Neste contexto, a informação sobre a estrutura genética do cobia é essencial para otimização da gestão da pesca e formação de plantéis de reprodutores nos diversos sistemas de cultivo. Desta forma, este estudo se propôs a analisar a diversidade e estruturação genética de populações naturais e de cultivo do cobia no Brasil. Com intuito de avaliar quanto da diversidade genética do cobia é observado nos espécimes selvagens do nordeste brasileiro, foram avaliados as relações filogenéticas com populações selvagens do cobia do Atlântico ocidental e de regiões Indo-Pacíficas a partir da análise de seqüências do DNA mitocondrial (*mtDNA*). As análises foram realizadas a partir de 1.525 pares de bases (pb) envolvendo duas regiões do *mtDNA* (Cytb e ATP6). Foi evidenciada uma baixa diversidade genética entre as populações das diferentes bacias oceânicas. Uma maior proximidade genética entre as amostras do Atlântico Norte e Sul ( $F_{ST} = 0,020$ ;  $p = 0,063$ ) foi observada. Contudo, a existência de *SNP's* em sítios específicos do *mtDNA* nas populações do Atlântico evidenciaram maior diferenciação genética destas com às amostras Indo-Pacíficas ( $F_{ST} = 0,842$ ;  $p = 0,000$ ). A estruturação genética do cobia no Brasil foi avaliada a partir da diversidade haplotípica e nucleotídica das sequências do *mtDNA* associadas a marcadores de microssatélites. As análises de diversidade molecular (AMOVA) realizada par-a-par entre grupos formados por espécimes selvagens e os de cultivo demonstraram a existência de uma diversidade molecular de 76% entre espécimes dentro destes dois grupos ( $F_{ST} = 0,2304$ ;  $p = 0,00$ ). Dos vinte locos de microssatélites analisados, quinze mostraram-se polimórficos nos dois grupos. De modo geral, os grupos de espécimes apresentaram

uma heterozigose próxima à esperada, sendo consideradas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Contudo, um nível moderado de diferenciação populacional foi observado entre estes grupos ( $\phi_{st} = 0,07231$ ;  $p = 0,000$ ). A maior diferenciação foi observada entre espécimes selvagens coletados na região litorânea do Piauí e os provenientes do sistema de cultivo de Pernambuco ( $\phi_{st} = 0,10156$ ;  $p = 0,000$ ). As análises do *mtDNA* e dos marcadores de microssatélites convergiram para uma baixa diversidade genética entre os espécimes selvagens e de cultivo. Contudo, uma estruturação de dois *pools* gênicos ( $k = 2$ ), sendo um formado por animais de cativeiro e o outro formado por espécimes de vida livre, foi identificada. Fato importante quando observamos que a atividade de cultivo de espécimes marinha é recente no Brasil e que políticas voltadas para conservação dos estoques naturais devem ser realizadas. Com base nessas diferenças genéticas, discussões sobre a comercialização de reprodutores do cobia entre as diversas empresas aquícolas devem ser analisadas, principalmente quando se diz respeito a reprodutores de origem Indo-Pacíficas.

Palavra-chave: Cobia; Diversidade Genética; DNA Mitocondrial; Microssatélites

## ABSTRACT

Aquaculture is an activity that has grown significantly in Brazil and worldwide. Among the species of marine fish of the Brazilian coast, bijupirá (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766), commonly known as cobia, is one of the ones that presents the greatest potential for the increase in fish production. Having gained space in the economic landscape of several countries and in order to ensure legal commercialization and to alleviate possible conflicts and impacts on the environment, the characterization of the genetic profiles of farmed fish and wild populations may reduce potential negative genetic impacts. In this context, information on the genetic structure of cobia is essential for optimizing fishery management and training breeding stock in the various cropping systems. Thus, this study aimed to analyze the diversity and genetic structuring of natural populations and cobia cultivation in Brazil. In order to evaluate how much of the genetic diversity of cobia is observed in the wild specimens of the Brazilian northeast, the phylogenetic relationships with wild populations of cobia of the western Atlantic and of the Indo-Pacific regions were analyzed from *mtDNA* sequences. The analyzes were performed from 1,525 base pairs (bp) involving two regions of *mtDNA* (Cytb and ATP6). There was a low genetic diversity among the populations of the different ocean basins. Greater genetic proximity between North Atlantic and South Atlantic samples ( $F_{ST} = 0,020$ ;  $p = 0,063$ ) was observed. However, the existence of *SNP*'s at specific *mtDNA* sites in the Atlantic populations showed a greater genetic differentiation of these with Indo-Pacific samples ( $F_{ST} = 0,842$ ;  $p = 0,000$ ). The genetic structure of cobia in Brazil was evaluated from the haplotype and nucleotide diversity of the *mtDNA* sequences associated with microsatellite markers. Molecular diversity analyzes (AMOVA) performed in pairs between groups of wild and cultivated specimens demonstrated the existence of a 76% molecular diversity between specimens within these two groups ( $F_{ST} = 0,2304$ ;  $p = 0,00$ ). Of the twenty microsatellite loci analyzed, fifteen were polymorphic in both groups. In general, the groups of specimens showed a heterozygosity close to that expected, being considered in Hardy-Weinberg equilibrium. However, a moderate level of population differentiation was observed among these groups ( $\phi_{st} = 0,07231$ ;  $p$

= 0,000). The highest differentiation was observed among wild specimens collected in the coastal region of Piauí and those from the Pernambuco farming system ( $\phi_{st} = 0,10156$ ;  $p = 0,000$ ). Analyzes of *mtDNA* and microsatellite markers converged to low genetic diversity between wild and cultivated specimens. However, a structuring of two gene pools ( $k = 2$ ), one consisting of captive animals and the other formed by free - living specimens, was identified. This is an important fact when we observe that the activity of growing marine specimens is recent in Brazil and that policies aimed at the conservation of natural stocks must be carried out. Based on these genetic differences, discussions on the commercialization of cobia breeders among the various aquaculture companies should be analyzed, especially when it comes to breeders of Indo-Pacific origin.

Keyword: Cobia; Genetical diversity; Mitochondrial DNA; Microsatellite

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1.** Produção mundial de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em toneladas (eixo Y) no período de 2007 a 2014 (Fonte: FAO 2007-2014, FISHSTAT).....22
- FIGURA 2.** O cobia (*Rachycentron canadum*, Rachycentridae) é uma espécie de peixe marinho perciforme e único representante do gênero *Rachycentron*. Imagem disponível em: ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rachycentron\\_canadum\\_Robertson.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rachycentron_canadum_Robertson.jpg)) .....23
- FIGURA 3.** Distribuição mundial do bijupirá ao longo das águas tropicais e subtropicais com as respectivas probabilidades relativas de ocorrência da espécie. Imagem disponível em: ([http://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular#](http://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular#)).....24

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1.** Árvore consenso obtida por inferência Baesiana a partir dos haplótipos encontrados nas populações do cobia nas diferentes bacias oceânicas referente à matriz haplotípica Cytb\_352. As topologias tiveram seus nós construídos segundo parâmetros de probabilidade, onde cada um de seus ramos foi estimado de acordo com o seu surgimento. O haplótipo DQ497841 (representado de azul) é o *out-group* de escolha para o gene Cytb nas análises filogenéticas. As bacias oceânicas foram representadas pelas cores de cada haplótipo tal que: vermelho (Atlântico sul), verde (Atlântico norte) e preto (genomas Indo-Pacíficas).....46
- FIGURA 2.** Rede de haplótipos construída a partir mtDNA para o gene Cytb\_352 nas populações do cobia amostradas nas regiões litorâneas do nordeste do Brasil, costa leste dos Estados Unidos e regiões Indo-Pacíficas (G\_R). Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência no grupo amostrado no presente estudo. Os números representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. ....47

### CAPÍTULO 3

- FIGURA 1.** Sistema de cultivo do cobia (*Rachycentron canadum*) de parques aquícolas em três estados brasileiro. ....64

**FIGURA 2.** Rede de haplótipos construída a partir *mtDNA* para os genes *ATP6* e *Ctyb* nas populações do cobia amostradas em cinco estados do território brasileiro e da sequência do genoma completo disponível no GenBank. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência no grupo amostrado no presente estudo. Os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo.....72

**FIGURA 3.** (A) Valores de  $\Delta K$  para cada valor de  $K$ , calculado de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005), onde o maior valor de  $\Delta K$  corresponde ao  $K$  ótimo. (B) Gráfico representando a melhor estruturação genética para a população de cobia amostrados a partir de espécimes selvagens e os provenientes dos sistemas de cultivo de São Paulo e da Bahia.....79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**TABELA 1.** Relação de haplótipos (H) do *mtDNA* para os genes ATP6 e Cytb e suas frequências absolutas em cada população. G\_R é o genoma de referência, representando os genomas completos referenciados na plataforma GenBank. Os números representam a posição dos sítios variáveis no genoma de referência. Cytb\_352 e Cytb\_245 representam fragmentos do gene Cytb. As regiões que apresentaram similaridade de nucleotídica com o G\_R foram representadas por (.). Os espaços em branco representam regiões do *mtDNA* não analisadas nas diferentes bacias oceânicas.....43

### CAPÍTULO 3

**TABELA 1.** Haplótipos (H) identificados para os genes mitocondriais nas populações de cobia (*Rachycentron canadum*) amostradas neste estudo, a posição das substituições observadas e frequência dos haplótipos nas populações estudadas. ....70

**TABELA 2.** Valores de  $F_{ST}$  (diagonal inferior) entre pares de populações de cobia (*Rachycentron canadum*) a partir das sequências de nucleotídeos do *mtDNA*. Valores de p (diagonal superior) com nível de significância igual a 0,05. ....71

**TABELA 3.** Estimativa de heterozigose por Nei's fornece a  $H_o$  (Heterozigose observada),  $H_s$  (Divergência genética dentro das populações),  $H_t$  (Heterozigose total),  $D_{st}$  (divergência genética entre populações),  $G_{st}$  (Proporção da diversidade total que está entre as populações) e  $G_{st}'$  (coeficiente de endogamia intrapopulacional).....73

**TABELA 4.** Variação alélica em loci de microssatélites em cada uma dos grupos de espécimes de cobia (*Rachycentron Canadum*). Estimativa de número de alelos diferentes ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), heterozigose observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ) e índice de fixação (F). ....74

**TABELA 5.** Estimativa de fluxo de genes ( $N_m$ ) para cada loci e estimativas da porção da variação total das populações (Fit), endogamia devido ao sistema reprodutivo (Fis) e porção da variação total encontrada entre todas as populações (Fst).....76

**TABELA 6.** Déficit de heterozigotos dentro das subpopulações (Fis) calculada em cada loco. ..76

**TABELA 7.** Valores de  $\phi_{st}$  (diagonal inferior) entre pares de populações de cobia em todos os loci. Valores de p (diagonal superior). Valores significativos ( $P < 0,05$ ).....77

## ANEXOS

### CAPÍTULO 2

- ANEXO 1.** Modelos evolutivos sugeridos para cada conjunto de dados pelo programa Partition Finder.....56
- ANEXO 2.** Árvores consensos obtidas a partir dos modelos evolutivos sugeridos para cada sequência parcial de nucleotídeos do *mtDNA*. (A) topologia obtida a partir das sequências parciais de nucleotídeos do gene ATP6 e (B) referente a matriz Cytb\_245.....57

### CAPÍTULO 3

- ANEXO 1.** Loci de microssatélites utilizados para a caracterização genética das populações de cobia. ....86
- ANEXO 2.** Desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos do cobia. ( $\chi^2$  : Valores de qui-quadrado; Df: graus de liberdade).....87
- ANEXO 3.** Variação alélica em cada locos em análise no cobia (*Rachycentron canadum*). Número de alelos encontrados (N), número de alelos diferentes (Na), número de alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e índice fixação (F).....88

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

<b>AMOVA</b>	<i>Analyses of Molecular Variance</i> – Análise de Variância Molecular
<b>ATP6</b>	Adenosinatrifosfatase Subunidade 6
<b>BA</b>	Bahia – Estado Brasileiro
<b>CE</b>	Ceará – Estado Brasileiro
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>CTAB</b>	<i>Hexadecylmatylammonium Bromide</i> - Brometo de Hexadecilmetilamônio
<b>Cytb</b>	Citocromo b
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleotídeos
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<b>EHW</b>	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
<b>IB</b>	Inferência Bayesiana
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
<b>mtDNA</b>	DNA Mitocondrial
<b>MV</b>	Máxima Verossimilhança
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia de Polimerase
<b>PE</b>	Pernambuco – Estado Brasileiro
<b>PI</b>	Piauí – Estado Brasileiro

<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SEAP/PR</b>	Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República do Brasil
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
<b>SP</b>	São Paulo – Estado Brasileiro
<b>STRs</b>	<i>Short Tandem Repeats</i> – repetições pequenas em tandem
<b>Taq</b>	<i>Thermus Aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris Borato de EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>UV</b>	Ultra-Violeta
<b>V</b>	Voltagem

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Df</b>	Grau de Liberdade
<b>Dst</b>	Divergência Genética Entre Populações
<b>F</b>	Índice de Fixação
<b>F<sub>is</sub></b>	Endogamia Devido ao Sistema Reprodutivo
<b>F<sub>it</sub></b>	Estimativas da Porção da Variação Total das Populações
<b>F<sub>ST</sub></b>	Divergência Genética Entre Populações
<b>G<sub>ST</sub></b>	Diferenciação Genética Entre Populações
<b>Gst'</b>	Coefficiente de Endogamia Intrapopulacional
<b>Hd</b>	Diversidade Haplotípica
<b>He</b>	Heterozigosidade Esperada
<b>Ho</b>	Heterozigosidade Observada
<b>Hs</b>	Divergência Genética Dentro das Populações
<b>Ht</b>	Heterozigose Total
<b>N</b>	Número de Alelos
<b>Na</b>	Número de Alelos Diferentes
<b>Ne</b>	Número de Alelos Efetivos
<b>Nm</b>	Fluxo Gênico
<b>μl</b>	Microlitro
<b>π</b>	Diversidade Nucleotídica
<b>χ<sup>2</sup></b>	Valores de Qui-quadrado
<b>Φ<sub>st</sub></b>	Divergência Genética Entre Populações a Partir de Marcadores STRs

# ÍNDICE

RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
ANEXOS .....	XIII
CAPÍTULO 1.....	20
AQUICULTURA BRASILEIRA: SISTEMA DE CULTIVO DO COBIA.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. AQUICULTURA NO BRASIL .....	21
1.2. ESPÉCIE ALVO: O COBIA.....	23
1.3. DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
4. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	30
5. REFERÊNCIAS .....	31
CAPÍTULO 2.....	35
ANÁLISE FILOGENÉTICA DO COBIA ( <i>RACHYCENTRON CANDUM</i> ) DO ALTÂNTICO E DO OCEANO ÍNDICO COM BASE EM SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL.....	36
RESUMO .....	36
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
2.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS COLETADAS .....	38
2.2. EXTRAÇÃO DO DNA.....	38
2.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL E SEQUENCIAMENTO .....	39
2.4. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA.....	40
3. RESULTADOS .....	42

3.1.	<i>DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DAS AMOSTRAS DE COBIA DO ATLÂNTICO SUL (BRASIL)</i> .....	42
3.2.	<i>DIVERSIDADE GENÉTICA DO COBIA DO ATLÂNTICO E DO OCEANO ÍNDICO</i> .....	44
3.3.	<i>ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DAS POPULAÇÕES NATURAIS DO COBIA DO ATLÂNTICO E DO OCEANO ÍNDICO</i> .....	45
<b>4.</b>	<b><i>DISCUSSÃO</i></b> .....	<b>48</b>
4.1.	<i>DIVERSIDADE GENÉTICA</i> .....	48
4.2.	<i>INFERÊNCIAS SOBRE A HISTÓRIA DA POPULAÇÃO A PARTIR DA DIVERSIDADE GENÉTICA</i> .....	50
<b>5.</b>	<b><i>CONCLUSÕES</i></b> .....	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b><i>REFERÊNCIAS</i></b> .....	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b><i>ANEXOS</i></b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....		<b>59</b>
<b>ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO SELVAGEM E DE CULTIVO DO COBIA (<i>RACHYCENTRON CANADUM</i>) NO BRASIL</b> .....		<b>60</b>
<b>RESUMO</b> .....		<b>60</b>
<b>1.</b>	<b><i>INTRODUÇÃO</i></b> .....	<b>60</b>
<b>2.</b>	<b><i>MATERIAL E MÉTODOS</i></b> .....	<b>62</b>
2.1.	<i>COLETA DE AMOSTRAS</i> .....	62
2.2.	<i>PLANTEL DE REPRODUTORES DOS SISTEMAS DE CULTIVO</i> .....	63
2.3.	<i>EXTRAÇÃO DO DNA</i> .....	64
2.4.	<i>AMPLIFICAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL E SEQUENCIAMENTO</i> .....	65
2.5.	<i>GENOTIPAGEM COM MICROSSATÉLITES</i> .....	66
2.6.	<i>ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE DNA</i> .....	67
2.7.	<i>ANÁLISE POPULACIONAL</i> .....	67
2.8.	<i>ANÁLISE DE DADOS DE GENOTIPAGEM</i> .....	68
<b>3.</b>	<b><i>RESULTADOS</i></b> .....	<b>68</b>
3.1.	<i>DIVERSIDADE GENÉTICA DO COBIA A PARTIR DE DADOS DO MTDNA.</i> .....	68
3.2.	<i>DIVERSIDADE GENÉTICA DO COBIA A PARTIR DE LOCI DE MICROSSATÉLITES.</i> .....	72
3.3.	<i>ESTRUTURA GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL</i> .....	73
3.4.	<i>ANÁLISE DE ESTRUTURA GENÉTICA</i> .....	78
<b>4.</b>	<b><i>DISCUSSÃO</i></b> .....	<b>80</b>
4.1.	<i>VARIABILIDADE DOS ESTOQUES NATURAIS E DE SISTEMAS DE CULTIVO</i> .....	80
4.2.	<i>ENDOGAMIA NOS ESTOQUES</i> .....	82
4.3.	<i>POTENCIAL DE EXPLORAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM TERMOS COMERCIAL</i> .....	82

5.	<i>CONCLUSÃO</i> .....	83
6.	<i>REFERÊNCIAS</i> .....	84
7.	<i>ANEXOS</i> .....	86

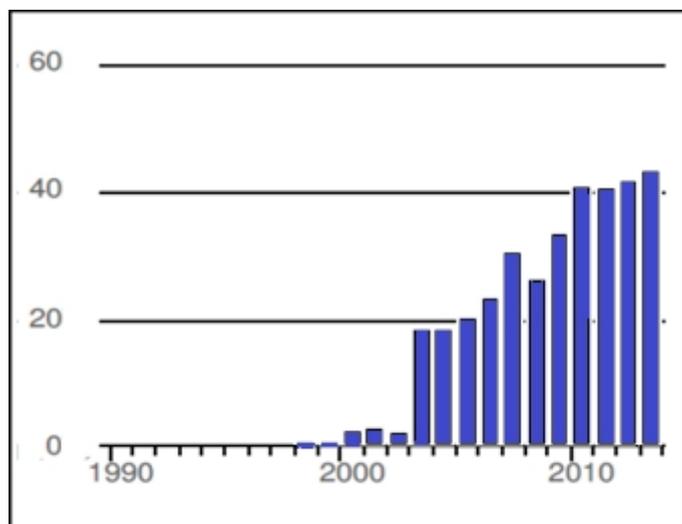
# CAPÍTULO 1

## 1. Introdução

### 1.1. Aquicultura no Brasil

Os primeiros registros de cultivos de espécies marinhas datam dos anos de 1400 na Indonésia. Porém, a piscicultura passou a ganhar destaque no cenário comercial após os avanços metodológicos obtidos no Japão na década de 60 do século passado (Shepherd; Bromage, 1988). Desde então, a atividade pesqueira praticada em larga escala nos oceanos têm contribuído para a redução dos estoques de animais marinhos, além de provocar grandes alterações no ecossistema (Ward; Myers, 2005). Uma das alternativas apontadas para solucionar a demanda comercial da sociedade por peixe de água salgada, levando em consideração a preservação dos estoques naturais de peixes, moluscos, crustáceos, entre outros, é a maricultura, ou seja, o cultivo de animais marinhos.

Atualmente, a aquicultura é considerada uma importante fonte de alimento de origem animal no Brasil e no mundo. A crescente importância desta atividade baseia-se no fato de ser uma alternativa à pesca extrativista, a qual chegou ao seu limite máximo sustentável (FAO, 2009). Assim, com a produção pesqueira estabilizada, a aquicultura tem sido apontada como um dos caminhos mais eficientes para a redução do déficit entre a demanda e a oferta de pescado no mercado mundial. Em nível global, a criação de peixes marinhos já se posiciona como o setor aquícola que mais cresce, tanto em volume, valor, como em número de espécie comercialmente cultivadas (FAO, 2013). Adicionalmente, a piscicultura marinha tem apresentado uma das maiores taxas anual de crescimento entre os vários setores da aquicultura (FAO, 2011). Uma marca expressiva desse crescimento foi estabelecida em 2011, quando a produção mundial atingiu 41 toneladas de cobia (*Rachycentron canadum*) pela aquicultura (Figura 1), tendo como principais produtores os países do continente asiático.



**FIGURA 1.** Produção mundial de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em toneladas (eixo Y) no período de 2007 a 2014 (Fonte: FAO 2007-2014, FISHSTAT).

Embora ainda incipiente, a produção comercial de peixes de água salgada no Brasil pode ser beneficiada pela associação da vasta área litorânea - com mais de oito mil quilômetros de costa abrangendo 17 estados brasileiros - com a tecnologia *offshore* desenvolvida no exterior, com destaque para as utilizadas em países asiáticos e americanos (Benetti et al., 2008).

Além dos fatores geográficos que beneficiam a aquicultura no território brasileiro, o governo federal, por intermédio do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), vem desenvolvendo políticas públicas com intuito de favorecer a regularização dos empreendimentos aquícolas, visando promover a sustentabilidade dessa atividade. São exemplos marcantes destas políticas: a resolução CONAMA nº413 que dispõe sobre o licenciamento ambiental da aquicultura, e o Decreto nº 4895/2003 e a Instrução Normativa Interministerial nº 6/2004 que tratam das cessões de uso de águas da União. Por sua vez, a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República do Brasil (SEAP/PR) consolidou, em 2008, a concessão de área destinada à criação de cobia na região sul do estado de São Paulo. Além disso, o MPA, através dos estudos de demarcação de parques aquícolas, tem investido fortemente para a criação e entrega de áreas próprias para o cultivo de cobia

(Ostrensky; Borghetti; Soto, 2008). Os primeiros pedidos de áreas de cultivo ocorreram em 2001, sendo direcionado pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e Ceará. Atualmente, o estado de Pernambuco é o único que possui local para cultivo de cobia em mar aberto, situado na plataforma continental do Estado, há 11 quilômetros da costa da praia de Boa Viagem, na cidade de Recife, pertencente à empresa Aqualider Ltda.

### 1.2. *Espécie alvo: o cobia*

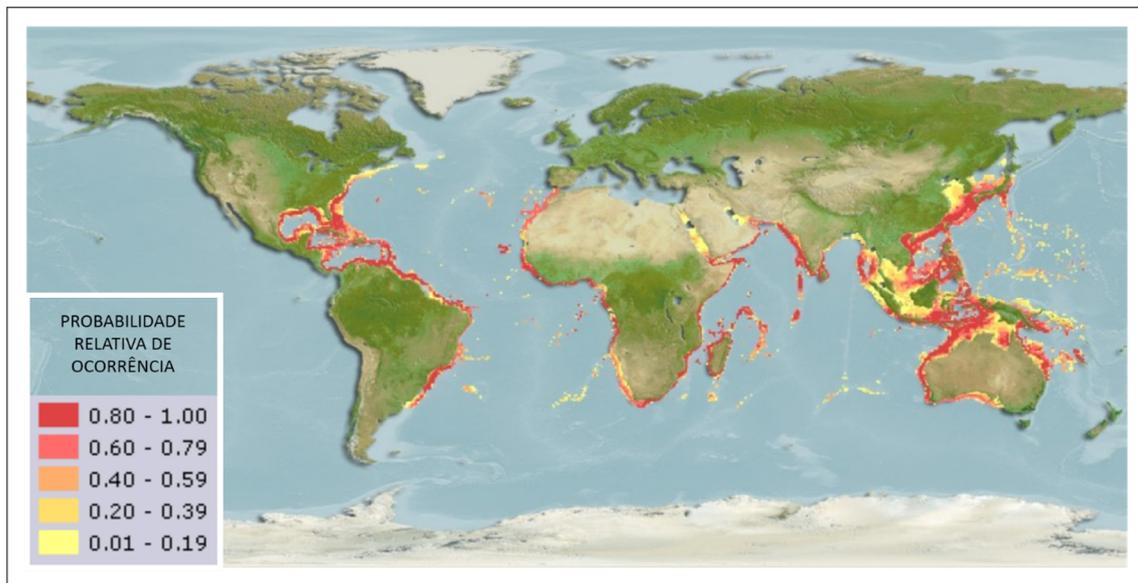
A escolha da espécie alvo do presente estudo, o cobia (*Rachycentron canadum*), surgiu a partir de um projeto interno desenvolvido na EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias) intitulado como: “Desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a criação do bijupirá no Brasil: nutrição, sanidade e recursos genéticos”. O melhoramento genético de espécies de importância econômica, dentro da cadeia produtiva, tem se mostrado como ponto estratégico para o crescimento sustentável da piscicultura nacional. Inúmeros resultados positivos têm sido alcançados com programas de melhoramento genéticos bem conduzidos (Ponzoni *et al.*, 2005). Face ao grande interesse mundial, o cobia apresenta-se como espécie que precisa ser atendido por um programa de melhoramento genético, algo ainda não colocado em prática no Brasil.

O cobia (*Rachycentron canadum*), também conhecido como bijupirá, beijupirá, pirambijú ou cação-de-escama (Carvalho Fiho, 1999), pertence à classe dos peixes ósseos da ordem Perciformes (Figura 2).



**FIGURA 2.** O cobia (*Rachycentron canadum*, Rachycentridae) é uma espécie de peixe marinho perciforme e único representante do gênero *Rachycentron*. Imagem disponível em: ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rachycentron\\_canadum\\_Robertson.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rachycentron_canadum_Robertson.jpg)).

Esta espécie encontra-se amplamente distribuída no litoral dos mares tropicais, subtropicais e temperada, com exceção da região litorânea do Pacífico oriental (Shaffer; Nakamura, 1989). Nas Américas, ocorre ao longo da costa do Atlântico ocidental compreendendo as regiões que vão desde o estado de Massachusetts, no EUA, à Argentina (Briggs 1958), sendo mais comuns no Golfo do México (Shaffer; Nakamura, 1989) (Figura 3).



**FIGURA 3.** Distribuição mundial do bijupirá ao longo das águas tropicais e subtropicais com as respectivas probabilidades relativas de ocorrência da espécie. Imagem disponível em: ([http://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular#](http://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular#)).

O cobia têm hábitos migratórios, que ocorrem principalmente na época de reprodução, uma vez que preferem águas mais quente (  $>20^{\circ}\text{C}$  ) (Hamilton; Domingues; Cavalli, 2014). A maturidade sexual é relatada em machos já no primeiro ou segundo ano de vida, enquanto que nas fêmeas somente é atingida após o segundo ano. Na época de reprodução, que ocorre preferencialmente entre os meses de abril e setembro, no hemisfério norte, e entre outubro e abril, no hemisfério sul (Lotz; Overstreet; Franks, 1996), a desova ocorre tanto perto da costa quanto no mar, onde as fêmeas liberam várias centenas de milhares de ovos, os quais serão então fertilizados pelos machos presentes. Os ovos viáveis que iniciam a etapa de

desenvolvimento são fortemente pigmentados, flutuante, e eclodem em aproximadamente 24 horas. As larvas desta espécie crescem rapidamente e são consideradas grandes quando comparadas com a maioria das espécies marinhas.

Na natureza, o cobia ocorre comumente isolado (Shaffer; Nakamura, 1989) ou em grupos pequenos, o que dificulta, em muitos casos, a captura de um número suficiente de indivíduos para o estabelecimento de um plantel de reprodutores. Dessa forma, os plantéis de reprodutores têm sido estabelecidos a partir da captura de juvenis selvagens, os quais são criados até a fase adulta. Este tipo de sistema tem sido estabelecido em vários países, como vem ocorrendo no sul dos EUA (Arnold; Kaiser; Holt, 2002) e em alguns lugares do Brasil (Lopes; Oliveira-Silva; Sena, 2001). Por outro lado, alguns países tem estabelecido seu plantel de reprodutores a partir da importação de formas juvenis produzidos em laboratório, como tem ocorrido na Ilha Réunion, África, que formou seu plantel a partir espécimes importadas de Taiwan (Hamilton; Domingues; Cavalli, 2014).

### 1.3. *Diversidade genética e marcadores moleculares*

A estrutura genética de uma população é determinada a partir da constituição gênica dos indivíduos da mesma espécie, sendo influenciada, principalmente, por fatores como as interações entre os diversos mecanismos evolutivos e ecológicos, os quais promovem, não raras vezes, variabilidade genética. Esta variabilidade genética observada nas mais diversas populações tem sido protagonista de diversos estudos sobre biologia da conservação, ecologia e evolução (Beheregaray, 2008), dada a sua importância para processos evolutivos e ecológicos, uma vez que ela se mostra como responsável por gerar e manter a diversidade biológica (Spalding *et al.*, 2007).

A diversidade genética encontrada no ambiente aquático se apresenta, muitas vezes, de modo complexo e de difícil entendimento. A distribuição da diversidade genética em ambientes aquáticos é gerada e mantida, principalmente, por barreiras à dispersão (Galarza *et al.*, 2009). Dessa forma, diferentes espécies podem ser estruturadas a partir de um pequeno fluxo de indivíduos à ambientes distintos (Mora; Sale, 2002). Não são raros os estudos com populações de peixes de água doce

indicando alta variabilidade genética entre espécimes de diferentes localidades (Ramos, 2007). Por outro lado, os peixes marinhos tendem a apresentar baixos níveis de variabilidade genética (Grant; Bowen, 1998), marcada, sobretudo, pela conectividade entre populações das diferentes bacias oceânicas associadas à ausência de barreiras oceanográficas.

Não obstante a complexa dinâmica da variabilidade genética em populações de peixes, os sistemas de cultivo enfrentam dificuldades tangentes ao manejo sustentável de espécies marinhas. Isso é devido, principalmente, a diminuição da variabilidade genética, típica dos sistemas de cultivo, os quais promovem perda do potencial no melhoramento genético (Melo *et al.*, 2006). A combinação de perfis genéticos entre espécimes de cultivo com populações selvagens da mesma espécie, potencializam os impactos genéticos negativos (Triantafyllidis *et al.*, 2007) decorrentes da depressão exogâmica.

Dado a importância da variabilidade genética para a manutenção da vitalidade reprodutiva, resistência à doença e capacidade de se adaptar às mudanças ambientais, a identificação de diversidade genética e como ela está organizada espacialmente fornecem dados fundamentais para a conservação das espécies. Segundo Costa (2008), o entendimento de como a variabilidade genética está distribuída, dentro e entre as populações, é de fundamental importância para quaisquer sistemas de conservação e melhoramento genético (Falconer, 1987), estando intimamente relacionada a processos de identificação do nível de variabilidade nas populações de vida livre e, principalmente, nos estoques de reprodutores dos sistemas de cultivos.

Amplamente utilizados na identificação e diferenciação de populações, os marcadores moleculares têm se apresentado como ferramentas importantes dentro de diversos programas de melhoramento e conservação das mais variadas espécies (Foresti *et al.*, 2005). Segundo Eizirik (1996), para a utilização de estratégias adequadas para a conservação de uma espécie é necessária a reconstrução de um padrão evolutivo de uma determinada população. Para tanto, o uso de marcadores moleculares se tornam uma ferramenta adequada para captar e quantificar tais padrões. Entre os diversos tipos de marcadores disponíveis para pesquisas genéticas, destacam-se os marcadores do DNA mitocondrial (*mtDNA*), caracterizados por herança

uniparental, quase invariavelmente materna (Meyer, 1993), e os marcadores STRs (*Short Tandem Repeats*), que são ancorados no núcleo.

Os polimorfismos encontrados no *mtDNA*, por exemplo, tem sido utilizados como marcadores moleculares para fins de estudos populacionais desde os anos 1980 (Martins *et al.*, 2003). O *mtDNA* possui como característica importante para realização de estudos evolutivos a alta taxa de mutação (cinco a dez vezes maior que o DNA nuclear), a alta taxa evolutiva, (Ferguson *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1979; Harrison, 1989 e Frederico, 2006), além da baixa taxa (ou mesmo ausência) de recombinação gênica. Por sua vez, os marcadores de microssatélites (STRs) por possuírem natureza codominante e constituírem uma das classes mais polimórficas atualmente disponíveis (Ferreira e Gratapaglia, 1998), permitem a realização de inferências mais precisas sobre os parâmetros genéticos populacionais, e têm sido indicados para diversos estudos, entre eles destacam-se: o de variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, mapeamento genético, estudos de genética de populações e conectividade genética entre as diferentes populações (Bugarski-Stanojevic, 2011).

Embora o cobia apresente comportamento migratório, estudos com base na análise de marcadores do tipo microssatélite e haplótipos de DNA mitocondrial têm demonstrado que as populações selvagens desta espécie em suas diferentes bacias oceânicas possuem baixa variabilidade genética (Benetti *et al.* 2010). Por outro lado, já se tem observado uma diversidade genética quando comparado amostragens de diferentes regiões (Ali *et al.*, 2009). Este resultado não é surpreendente, dado que as diferenças genéticas entre populações de diferentes bacias oceânicas têm sido relatadas para várias espécies de peixes pelágicos (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010). Exemplo dessa diversidade tem sido observado em pesquisas realizadas na região norte do Golfo Pérsico e no Mar de Oman, as quais tem demonstrado a existência de três diferentes populações de bijupirá distribuídas entre as regiões de Bushehr, Bandar Abbas e Chabahar (Ali *et al.*, 2009). Por sua vez, estudos realizados nos EUA demonstram que o cobia amostrado nas águas costeiras da Virgínia, Mississipi e Louisiana são geneticamente homogêneos entre si, porém se diferem acentuadamente dos que habitam as águas de Taiwan, no mar asiático (Gold *et al.*, 2013).

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com o cobia (*Rachycentron canadum*) objetivando avaliar a conectividade e diversidade genética entre populações naturais das diferentes bacias oceânicas, bem como avaliar variabilidade genética entre os diferentes sistemas de cultivo estabelecidos no Brasil. Dessa forma, o conhecimento da variabilidade e divergência genética entre os estoques naturais ou cultivados poderá contribuir para manutenção da variabilidade genética nos programas de cultivo, bem como desenvolvimento de um manejo adequado.

## 2. *Justificativa*

A atividade de cultivo de cobia no Brasil é inovadora e tem demonstrado que quando destinada a produção em larga escala torna-se uma atividade economicamente atraente, principalmente quando se considera o potencial de produção das espécies marinhas (Sanches, 2008). O exemplo marcante dessa viabilidade econômica é verificado na produção de cobia em Taiwan, que apesar de destinar apenas 0,08% da área total voltada à aquicultura para cultivo dessa espécie, consegue atingir um faturamento que corresponde à cerca de 14% do total do setor de pescados (Chang, 1999).

Entendendo o potencial que o cobia pode representar para alavancar a piscicultura marinha no Brasil, a caracterização da variabilidade genética de populações naturais da costa brasileira, assim como os de cultivos mantidos em cativeiro, torna-se fundamental para orientar as práticas de manejo desta espécie. Adicionalmente, a análise da estruturação genética poderá fornecer informações importantes para compreender o processo evolutivo desta espécie.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo caracterizar a diversidade genética de populações naturais e de cativeiro do *Rachycentron canadum*, de forma a subsidiar e potencializar a criação dos futuros programas de melhoramento e conservação desta espécie no país.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar a relação filogenética entre a população silvestre do nordeste brasileiro e as demais populações da espécie-alvo estudadas previamente;
- Estimar o nível de diferenciação genética entre a população silvestre do nordeste brasileiro e as demais populações da espécie-alvo estudadas previamente;
- Estimar o nível de diferenciação genética entre a população silvestre do nordeste brasileiro e os cultivos de cativeiro da espécie-alvo no Brasil;
- Comparar os níveis de variabilidade genética obtidos pelos diferentes marcadores moleculares utilizados (*mtDNA* e microssatélites);
- Estimar o nível de endogamia dos cultivos da espécie-alvo e
- Apresentar orientações que possam subsidiar a tomada de decisões no que tange o manejo genético da espécie-alvo de forma integrada.

#### 4. Organização da dissertação

Esta dissertação foi elaborada em formato de artigos, sendo o primeiro (Capítulo 2) intitulado como “Análise filogenética do cobia (*Rachycentron candum*) do Atlântico e do oceano Índico com base em sequências do DNA mitocondrial”, onde são abordados as relações filogenéticas entre os diversos haplótipos encontrados nas bacias oceânicas do Atlântico e do Índico. O segundo artigo (Capítulo 3), por sua vez, intitulado “Estruturação genética da população selvagem e de cultivo do cobia (*Rachycentron candum*) no Brasil” avaliou a estrutura da diversidade genética entre espécimes selvagens e os provenientes de sistemas de cultivo no Brasil.

## 5. Referências

- ALI, M. et al. **Population Genetic Structure of bijupirá, *Rachycentron canadum* Revealed by Microsatellite Markers.** v. 3, n. 1, p. 103–107, 2009.
- ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. **Spawning of Bijupirá *Rachycentron canadum* in captivity.** World Aquaculture Society, v. 33, n. 2, p. 205–208, 2002.
- BEARDSLEY, G. L.; MERRETT, N. R.; RICHARDS, W. J. BIBLIO. Fish.Bull.U.S.Fish.Wild.Serv Bull.Mar.Sci.Gulf.Caribb. Connet Rep.Nankai Reg.Fish.Res.Lab, v. 393, n. 8, p. 139–71360, 1935.
- BENETTI, D. et al. **Bijupirá (*Rachycentron canadum*) hatchery-to-market aquaculture technology: recent advances at the University of Miami Experimental Hatchery (UMEH)**Revista Brasileira de Zootecnia,V. 39, p. 60-67, 2010.
- BENETTI, D. D. et al. **Advances in hatchery and grow-out technology of bijupirá *Rachycentron canadum* (Linnaeus).** Aquaculture Research, v. 39, n. 7, p. 701–711, 2008.
- BENETTI, D.; ORHUN, M.; ZINK, I. **Aquaculture of Bijupirá (*Rachycentron canadum*) in the Americas and the Caribbean.** Bijupirá aquaculture, p. 1–21, 2007.
- BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular ecology* v. 17, p. 3754–3774, 2008.
- BRIGGS, J.C. **Fishes of world-wide (circumtropical) distribution.** *Copeia* , v.3, p.171-180, 1960.
- BURNS, K. M., C. NEIDIG, J. LOTZ, AND R. OVERSTREET. **Bijupirá ( *Rachycentron canadum* ) stock assessment study in the Gulf of Mexico and in the South Atlantic.** Mote Marine Laboratory, Technical Report 571, Sarasota, Florida, 1998.
- CARVALHO FILHO, A. **Peixes da Costa brasileira.** São Paulo: Ed. Melro. p. 320, 1999
- CARVALHO FILHO, J. **Bijupirá em viveiro de terra.** Panorama da Aquicultura, 20(120): p. 46-49, 2010
- CHANG, S.L.; HSIEH, C.S.; CHAO, Z.L. et al. **Notes on artificial propagation and grow-out techniques of bijupirá (*Rachycentron canadum*).** *Fish World Mag.* , v.270, p.14-26, 1999.
- CARPENTER, K. E. **The living marine resources of the Western Central Atlantic.** Volume 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes; American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5 FAO, 2002.
- CHATTERJI, S.; PACTER, L. Reference based annotation with GeneMapper. **Genome biology**, v. 7, n. 4, p. R29, 2006.
- DÍAZ-JAIMES, P. et al. **Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): The influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 57, n. 3, p. 1209–1218, 2010.
- EIZIRIK, E. **Ecologia Molecular, genética da conservação e conceito de Unidades Evolutivamente Significativa, Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.23-29, 1996.

- FALCONER, D.S. Introdução a genética quantitativa. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.
- FAO. FISHSTAT PLUS: **Universal software for fishery statistical time series** . Version 2.3.2000. Fisheries Department Fishery Information, Data and Statistics Unit, FAO, Rome, Italy. 2011.
- FAO 2007-2016. **Cultured Aquatic Species Information Programme *Rachycentron canadum*. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées**. Texte par J.B. Kaiser, J.G. Holt. Dans: Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO [en ligne]. Rome. 2016. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentron\\_canadum/fr](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentron_canadum/fr)
- FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODHOL, A., McMELL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P., HYNES, R.A. (1995). **The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo***. J Fish Biol, v.47, suppl.A, p.103-126.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; REVALDAVES, E; FORESTI, F. P. e SANTOS, S.A. Análise genética de estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da estação de piscicultura de promessa, utilizando marcadores de RAPD. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP. 2005.
- GALARZA, J. A. et al. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. v. 106, n. 5, p. 1473–1478, 2009.
- GAUMET, F.; BABET, M.C.; BETTES, A. et al. **Advances in bijupirá, *Rachycentron canadum*, research in La Réunion Island (France): problems and perspectives**. In: LIAO, I.C. e LEAÑO, E.M. Bijupirá Aquaculture: research, development and commercial production. Taiwan: Asian Fisheries Society, p.115-129, 2007.
- GOLD, J. R. et al. **Population Genetic Comparisons among Bijupirá from the Northern Gulf of Mexico, U.S. Western Atlantic, and Southeast Asia**. North American Journal of Aquaculture, v. 75, n. 1, p. 57–63, 2013.
- GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. Journal of Heredity, v. 89, p. 415–426, 1998.
- HAMILTON, S.; DOMINGUES, E. C.; CAVALLI, R. O. **Desempenho reprodutivo do beijupirá (*Rachycentron canadum*) capturado no litoral de Pernambuco**. 2014.
- HAMILTON, S.; SEVERI, W.; CAVALLI, R. O. **Biologia e aquicultura do beijupirá: uma revisão biology and aquaculture of bijupirá : a review**. Bol. Inst. Pesca, 2013.
- LOPES, P. R. D.; OLIVEIRA-SILVA, J. T. DE; SENA, M. P. **Ocorrência de *rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) (Actinopterygii: Rachycentridae) na baía de Todos os Santos, estado da Bahia, Brasil**. 56 Scientia Série Ciências Biológicas, v. 1, n. 1, p. 56–59, 2001.
- LOTZ, J. M.; OVERSTREET, R. M.; FRANKS, J. S. **Gonadal maturation in the bijupirá, *Rachycentron canadum*, from the Northcentral Gulf of Mexico**. Gulf Research Reports, v. 9, n. 3, p. 147–159, 1996.

- MARTINS, C., WASKO, A. P., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. **Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River Basin**. Genetic and molecular biology. v. 26: 1, p. 33-38, 2003.
- MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, p.87-93, 2006.
- MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z. Hybridization Probes for Conventional DNA Fingerprinting Used as Single Primers in the Polymerase Chain Reaction To Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*. v. 31, n. 9, p. 2274–2280, 1993.
- MORA, C.; SALE, P. F. Are populations of coral reef fish open or closed? v. 5347, n. 1999, p. 422–428, 2002.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer**. [s.l.] Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 2008.
- PONZONI, R. W., HAMZAH, A., TAN, S., KAMARUZZAMAN N., 2005. Genetic parameters and response for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 247, 203-210.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, E. Rodrigues, p. 328, 2001.
- SANCHES, E.G.; SECKENDORFF, R.W.V.; HENRIQUES, M.B.; FAGUNDES, L.; SEBASTIANI, E.F. **Viabilidade econômica do cultivo do bijupirá (*Rachycentron canadum*) em sistema offshore**. Informações Econômicas, v. 38(12), p. 42-51, 2008.
- SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of Biological Data on the Bijupirá *Rachycentron canadum* (Pisces : Rachycentridae)**. 1989a.
- SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of Biological Data on the Bijupirá *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. [s.l.] NOAA Technical Report NMFS 82, FAD Fisheries Synopsis 153, 1989b.
- SHEPHERD, C. J.; BROMAGE, N. R.;(eds.); **Intensive Fish Farming**. Backwell, Oxford, p. 404, 1988.
- SPALDING, M. D. et al. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. BioScience v. 57, n. 7, p. 573, 2007.
- RAMOS, J. V. B. Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2007.
- TRIANAFYLLIDIS, A., N. KARAIKOU, F. BONHOMME, L. COLOMBO, D. CROSETTI, D. DANANCHER, E. GARCÍA-VAZQUEZ, J. GILBEY, T. SV ASAND, E. VERSPOOR, AND C. TRIANTAPHYLLIDIS. Management options to reduce genetic impacts of aquaculture activities. in T. Sv asand, D. Crosetti, E. Garcia-Vazquez, and E. Verspoor, editors. **Genetic impact of aquaculture activities on native populations**. Genimpact, Final Scientific Report, EU Contract n. RICA-CT-2005-022802, p.162–167, 2007.

- TURCHETTO-ZOLET, J. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L. B. Guia prático para estudos filogeográficos. 1 ed. Ribeiro Preto: SBG, Ribeiro Preto-SP, 2013, 105 p.
- WARD, P.; MYERS, R. A. Shifts In **Open-Ocean Fish Communities Coinciding With The Commencement Of Commercial Fishing**. *Ecology*, v. 86, n. 4, p. 835–847, abr. 2005.
- WANG, Z.-D., GUO, Y.-S., LIU, C.-W., & LIU, Y. **The Complete Mitochondrial Dna of Cobia (*Rachycentron Canadum*) and Phylogenetics of Carangoid**. *Acta Hydrobiologica Sinica*, v. 35(2), p. 229–237, (2011). <http://doi.org/10.3724/SP.J.1035.2011.00229>.

## CAPÍTULO 2

# ANÁLISE FILOGENÉTICA DO COBIA (*RACHYCENTRON CANDUM*) DO ATLÂNTICO E DO OCEANO ÍNDICO COM BASE EM SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL

## Resumo

A espécie Cobia (*R. canadum*) possui ampla distribuição em vários oceanos e estudos filogeográficos com *mtDNA* já foram realizados, especialmente no Oceano Índico. De forma a aumentar o conhecimento da estrutura genética da espécie o objetivo desse estudo foi reavaliar a diversidade genética e a estrutura populacional do cobia a partir de novas amostras coletadas no Brasil (N = 39) (Atlântico Sul) e comparar com as sequências já publicamente disponíveis (N = 191). Foram analisadas um total 1039 pb provenientes dos genes mitocondriais adenosinatrifosfatase subunidade 6 (ATP6) e o citocromo b (Cytb). A partir do gene Cytb foi observado uma baixa diversidade haplotípica e nucleotídica entre os espécimes selvagens no hemisfério norte e sul do Atlântico (N = 54, Hd = 0,211 e  $\pi$  = 0,00063), fato este também observado entre os espécimes do hemisfério sul do Atlântico e a amostragem do oceano Índico (N = 195, Hd = 0,280 e  $\pi$  = 0,00121), evidenciando uma baixa diversidade genética nesta espécie entre diferentes oceanos. Análises filogenéticas, realizadas a partir dos haplótipos amostrados nas populações selvagens desta espécie, demonstraram a fragmentação do ramo filético em dois, os quais passaram a evoluir de forma independente nas bacias oceânicas do Atlântico e da Índica. O clado mais recente tem se mostrado típico entre os espécimes selvagens encontrados no Atlântico.

## 1. Introdução

Populações com distribuição geográfica ampla podem apresentar conectividade variada, aspecto este relacionado não somente a abundância e a densidade de indivíduos na população, mas também influenciada por aspectos como habitat e escalas espaciais e temporais utilizadas (Kool *et al.*, 2012). Não é raro que altos índices de diversidade genética e estruturas geográficas complexas sejam encontrados em espécies com ampla distribuição (Grant & Bowen, 1998).

Nas águas continentais as causas de diferenciação genética entre os espécimes podem não ser evidentes e, além disso, barreiras geográficas ou físico-químicas podem determinar a estruturação genética de populações (Lessios *et al.*, 2007). Este fato tem se apresentado como um dos obstáculos nas pesquisas de conectividade nas populações marinhas tornando difícil a diferenciação entre população e subpopulação (Kool *et al.*, 2012).

Sabe-se que a dispersão é uma dos fatores envolvidos na persistência e evolução das espécies (Cowen *et al.*, 2007). Nesse sentido, espera-se que as correntes oceânicas promovam a conectividade entre as populações marinhas (Trembl *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2010), visto que nas espécies marinhas a fase larval representa o momento em que ocorre maior dispersão (Cowen *et al.*, 2007; Kinlan *et al.*, 2005). Não obstante às grandes distâncias que envolvem as diferentes bacias oceânicas, os peixes marinhos se mostram eficientes na produção de um elevado número de larvas e ovos com capacidade de dispersar através dos oceanos. Tal característica pode ser a explicação mais plausível para que peixes marinhos apresentem um baixo grau de diferenciação genética (Horau *et al.*, 2004; Grant & Bowen, 1998). Por outro lado, existem evidências de divergência genética entre populações de peixes marinhos decorrentes de gradientes ambientais (Gonzalez & Zardoya, 2007), barreiras oceanográficas para a dispersão e adaptação genética local (Williams *et al.*, 2008).

Tendo em vista que diferenças genéticas entre populações de diferentes bacias oceânicas têm sido relatadas para várias espécies de peixes pelágicos (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010), este estudo teve como objetivo rever os padrões filogeográficos do cobia (*Rachycentron canadum*). Esta espécie marinha é um peixe pelágico com ampla distribuição ao longo das águas tropicais e subtropicais em todo o mundo (Shaffer; Nakamura, 1989). Possui importância para atividade econômica de diversos países, apresenta comportamento migratório e está localizado em águas mais quentes (>20°C) (Hamilton *et al.*, 2014).

Estudos com base na análise de marcadores moleculares do tipo microssatélite e haplótipos de DNA mitocondrial têm demonstrado que as populações selvagens desta espécie apresentam alta similaridade genética (Benetti *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas com esta espécie nos Estados Unidos corroboram a alta

similaridade genética entre populações amostradas nas águas costeiras da Virgínia, Mississippi e Louisiana, porém se diferem acentuadamente dos que habitam as águas de Taiwan, no mar asiático (Gold *et al.*, 2013).

Como a espécie possui importância comercial é imprescindível, para quaisquer programas de melhoramento e conservação, o conhecimento da estrutura genética dos estoques selvagens. Diante disso e do fato que amostras do Atlântico foram pouco amostradas até o momento, este estudo teve como objetivo avaliar a relação filogenética de espécimens amostrados no Atlântico Sul, mais especificamente, no Nordeste do Brasil, com as demais populações do cobia analisadas no Atlântico norte e no oceano Índico, assim como identificar o nível de estruturação genética nesta espécie.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostras biológicas coletadas

Foram utilizadas amostras de tecidos (nadadeira, fígado ou músculo) de 39 espécimes de *Rachycentron canadum* amostrados em alto mar na região do Delta do Parnaíba (n = 33), divisa dos estados do Piauí e Maranhão, e na região costeira do Estado do Ceará (n = 6), compreendendo uma faixa litorânea de 639 quilômetros do Brasil (2°44'07.6"S 41°48'22.9"W a 4°49'52.0"S 37°15'09.2"W). O material biológico coletado foi armazenado em microtubos contendo álcool etílico absoluto.

### 2.2. Extração do DNA

De cada amostra coletada foram utilizadas, aproximadamente, 1cm<sup>3</sup> de material biológico para a extração do DNA total. A extração foi realizada seguindo o protocolo adaptado de Winnepenninckx *et. al.*, (2009) contendo detergente catiônico CTAB (hexadecylmatylammonium bromide) e 0,2% de 2-mercaptoetanol. As amostras de DNA extraídas foram diluídas em 50 uL de TE estéril (Tris-EDTA ph 8,0). A quantificação do DNA extraído foi feita por espectrofotometria por meio do aparelho nanodrop (Nanodrop ND1000). Para análise qualitativa as amostras do DNA genômico

foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

### 2.3. Amplificação do DNA mitocondrial e sequenciamento

Duas regiões do DNA mitocondrial (*mtDNA*) foram amplificadas por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR): a adenosinatrifosfatase subunidade 6 (ATP6) e o citocromo b (Cytb). O primeiro gene foi amplificado com os iniciadores H9076-ATP (5' GGG CGG ATA AAK AGG CTA AT 3') e o L8343 - LYS (5'AGC GTT GGC CTT TTA AGC TAA WGA TWG GTG 3') (Wang *et al.*, 2011), enquanto que o segundo gene foi amplificado pelo par de iniciadores H 15915-THR (5' ACC TCC GAT CTY CGG ATT ACA AGA 3') e o L 14734-GLU (5'AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT 3') (Wang *et al.*, 2011). As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2 µM de cada iniciador, 2,5 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de *Taq Polymerase* (Promessa®), 3 ng de DNA, tampão 10X em um volume final de 10 µl. Os parâmetros do termociclagem utilizados foram: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 90 segundos a 56 °C e 90 segundos a 72 °C, e um passo final de 7 minutos a 72 °C. Controles negativos (todos reagentes menos DNA) foram usados em cada conjunto de amostras amplificadas. O sucesso nas ampliações foi verificado pela visualização em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo e submetidos à eletroforese com uma voltagem de 120 volts por tempo variável. Um marcador de peso molecular de 1kb Plus (Invitrogen) foi utilizado em cada gel como referência para identificar amplificação dos fragmentos esperados. Os géis de agarose foram analisados em equipamento *Eagle Eye™ II* (Stratagene). Os produtos amplificados com sucesso foram purificados com 1µl de ExoSAP-IT® (USB® Product Affymetrix) a 37 °C por 30 minutos, seguido de aquecimento a 80 °C por 20 minutos. Posteriormente, a reação de sequenciamento foi feita seguindo o protocolo do kit BigDye® v.3 (*Applied Biosystems*).

A reação de sequenciamento foi purificada com 3 µl de EDTA a 125 mM e 25 µl de etanol a 100% e posterior centrifugação a 4 °C por 30 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, foi adicionando 30 µl de etanol 70% e realizada centrifugação à -4 °C por 15 minutos a 3.000 rpm. A solução foi descartada e o DNA ressuspendido com 10 µl de

formamida Hi-Di. A eletroforese capilar da reação de sequenciamento foi realizada no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (*Applied Biosystems*). As sequências de nucleotídeos geradas foram analisadas com o programa *SeqScape* versão 2.5 Applied Biosystems (Kosman *et al.*, 2001).

#### 2.4. Análise das sequências de DNA

Para reavaliar a filogeografia do cobia foram usadas todas sequências de nucleotídeos disponibilizadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), os quais formaram três conjuntos de dados. O primeiro conjunto (N = 15) é composto de amostras do Atlântico norte, capturados na costa leste dos Estados Unidos, abrangendo as regiões costeiras dos estados da Virginia, Mississippi e Louisiana (Gold *et al.*, 2013). O segundo conjunto (N = 166) é composto de amostras do oceano Índico, abrangendo a região litorânea da Índia e regiões da costa oeste Tailândia, no mar de Andaman (Musika *et al.*, 2014). Um terceiro conjunto, por sua vez, foi formado por sequências de nucleotídicas correspondentes a espécimes do cobia capturados na região costeira da Índia (N = 17), disponibilizados na mesma plataforma. Adicionalmente, quatro genomas mitocôndrias completos oriundos da China (FJ154956 e NC011219), Japão (AB355906) e Tailândia (KC782765) foram utilizados.

Todas as análises utilizaram como referência o genoma KC782765 (G\_R). A mesma não apresentou divergência nucleotídica em relação aos demais genomas encontrados para as duas regiões gênicas consideradas no presente estudo.

A análise do gene ATP6 foi realizada a partir um fragmento de 437pb, correspondente às posições 8150 a 8586 do genoma completo (KC782765). Para este gene foram, além das amostras brasileiras (N=39) foram usadas 21 amostras do GeneBank: 4 dos genomas completos e 17 do litoral da Índia (Oceano Índico).

Para o Cytb, por falta de complementariedade entre as sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank, dois conjuntos de análises independentes foram realizados para comparar com as 39 amostras do Brasil: (I) Cytb\_352 e (II) Cytb\_245. No primeiro um fragmento de 352pb, localizado entre as posições 14784 a 15135 (KC782765), foi comparado com 15 sequências dos Estados Unidos (Oceano Atlântico

Norte) (Gold *et al.*, 2013). No segundo conjunto, um fragmento de 245pb localizado entre as posições 15319 a 15563 (KC782765), foi comparado com sequências provenientes da Índia e Tailândia (n = 166 sequências, Oceano Índico) (Musika *et al.*, 2014).

O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado com o algoritmo *Clustal W* (Hall, 1999) no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Em seguida, para cada conjunto de dados foram estimados os seguintes índices de diversidade: o número de sítios polimórficos, composição nucleotídica e diversidade haplotípica usando os programas DNAsp versão 5 (Librado *et al.*, 2009) e Arlequin versão 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

As análises de reconstrução filogenéticas foram realizadas a partir dos haplótipos únicos encontrados em cada conjunto de dados dos genes ATP6 e Cytb. Foi usado o método da máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB) (Ronquist *et al.*, 2011). Foram usados como *outgroup* para o gene ATP6 uma sequência de *Caranx tille Cuvier* (KT805946) que apresentou 74% de similaridade gênica com cobia. Para o gene Cytb foi usado uma sequência de *Lepidocybium flavobrunneum* (DQ497841) que apresentou 99% de similaridade.

Os haplótipos foram analisados com o programa Partition Finder (Lanfear, 2012) para seleção do modelo evolutivo que se adequava melhor a cada conjuntos de dados. A escolha do melhor modelo evolutivo foi baseada no critério de AKAIKE. A árvore consenso que melhor representou as relações filogenéticas entre os haplótipos foi obtida a partir da análise de inferência bayesiana (IB) com o programa MrBayes (Ronquist *et al.*, 2011), que consistiu em duas corridas de quatro cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 20000000 de gerações com amostragem a cada 1000 gerações. O programa Tracer (Drummond *et al.*, 2012) foi usado para avaliar a convergência dos parâmetros amostrados pelas análises, sendo descartadas 20% das árvores amostradas inicialmente (*burn-in*). As árvores consensos foram remontadas a partir do programa FigTree (Rambaut, 2009).

### 3. Resultados

#### 3.1. Diversidade e estrutura genética das amostras de cobia do Atlântico Sul (Brasil)

Um total de 1525pb foram sequenciados e analisados para duas regiões do *mtDNA* concatenadas para as 39 amostras de espécimes selvagens do cobia do Atlântico Sul. Foram identificados seis sítios variáveis e cinco haplótipos (Tabela 1). O gene ATP6 se mostrou bastante conservado com apenas um sítio polimórfico e dois haplótipos. A diversidade haplotípica foi ( $H_d$ ) de 0,049 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00011. A mutação no gene ATP6 foi uma transição entre as bases guanina e adenina (G/A) no sítio 8231 do genoma completo e foi observada em apenas um espécime coletado no estado do Ceará (H\_21, Tabela 1).

No gene *Cytb*, por sua vez, foram identificados cinco sítios variáveis, sendo três informativos para parcimônia, os quais formaram quatro haplótipos (H\_17 a H\_20) com uma diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,463 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00052 (Tabela 1). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) corroborou com a baixa diferenciação genética ( $F_{ST} = -0,051$ ,  $p > 0,05$ ) nas amostras do litoral do nordeste brasileiro.

**TABELA 1.** Relação de haplótipos (H) do *mtDNA* para os genes ATP6 e Cytb e suas frequências absolutas em cada população. G\_R é o genoma de referência, representando os genomas completos referenciados na plataforma GenBank. Os números representam a posição dos sítios variáveis no genoma de referência. Cytb\_352 e Cytb\_245 representam fragmentos do gene Cytb. As regiões que apresentaram similaridade nucleotídica com o G\_R foram representadas por (.). Os espaços em branco representam regiões do *mtDNA* não analisadas nas diferentes bacias oceânicas.

REFERÊNCIA	G_R	HAPLÓTIPO	ATP6										Cytb										FREQUÊNCIA ABSOLUTA	LOCALIDADE								
			8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1
		KC782765	G	G	G	G	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T		TAILÂNDIA
	H_1	JX149559																			.	C	.	C							12	EUA
ATLÂNTICO NORTE	H_2	JX149560																			.	.	.	C							1	EUA
	H_3	JX149561																			.	.	T	C							1	EUA
	H_4	JX149563																			C	.	.	C							1	EUA
	H_5	KC243643																			.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	138	TAILÂNDIA
	H_6	KC243617																			.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	13	TAILÂNDIA
	H_7	KC243504																			.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_8	KC243524																			.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_9	KC243525																			.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	1	TAILÂNDIA
OCEANO ÍNDICO	H_10	KC243549																			.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_11	KC243554																			.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_12	KC243583																			.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	2	TAILÂNDIA
	H_13	KC243589																			.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_14	KC243614																			.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	3	TAILÂNDIA
	H_15	KC243615																			.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	3	TAILÂNDIA
	H_16	KC243622																			C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	TAILÂNDIA
	H_17	COBIA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	BRASIL
ATLÂNTICO SUL	H_18	COBIA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	BRASIL
	H_19	COBIA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29	BRASIL
	H_20	COBIA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	BRASIL
	H_21	COBIA	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	BRASIL
	H_22	KJ619957	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_23	KJ619955	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_24	KJ619956	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_25	KJ619954	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
OCEANO ÍNDICO	H_26	KM211969	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_27	KM211966	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_28	KM211968	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_29	JX292990	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_30	KM211970	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA
	H_31	JX292988	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	ÍNDIA

### 3.2. *Diversidade genética do cobia do Atlântico e do oceano Índico*

A matriz nucleotídica do gene ATP6 foi analisada quanto à diversidade haplotípica e nucleotídica entre os grupos do Atlântico sul e oceano Índico. As análises demonstraram a existência de nove sítios variáveis os quais formaram onze haplótipos com uma diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,303 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00075 (Tabela 1). Um número maior de sítios polimórficos é observado no grupo do oceano Índico, porém uma baixa divergência genética entre os haplótipos formados é evidenciada ( $H_d = 0,794$  e  $\pi = 0,00241$ ). O haplótipo H\_31 apresentou menor divergência genética em relação aos demais haplótipos, apenas um sítio polimórfico.

Para o banco de dados Cytb\_352 foram observados a existência de quatro sítios variáveis que formaram cinco haplótipos com diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,211 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00063. Dos haplótipos encontrados, quatro foram observados na população do cobia do Atlântico (H\_1 a H\_4;  $H_d = 0,136$  e  $\pi = 0,00040$ ), enquanto no grupo do oceano Índico foi observado apenas um haplótipo (G\_R, Tabela 1). Os espécimes do Atlântico sul formaram apenas um haplótipo (H\_2), sendo este compartilhado com o cobia do Atlântico norte. Por outro lado, a sequência de nucleotídeos do genoma de referência (G\_R) ainda não foi observada no Atlântico.

A AMOVA para as duas populações do cobia do Atlântico demonstrou alta similaridade gênica ( $F_{ST} = 0,020$ ;  $p = 0,063$ ), ao se analisar o fragmento Cytb\_352. Contudo, a AMOVA entre espécimes provenientes do Atlântico norte e os genomas dos oceanos Índico e Pacífico indicaram baixa similaridade gênica ( $F_{ST} = 0,842$ ;  $p = 0,000$ ).

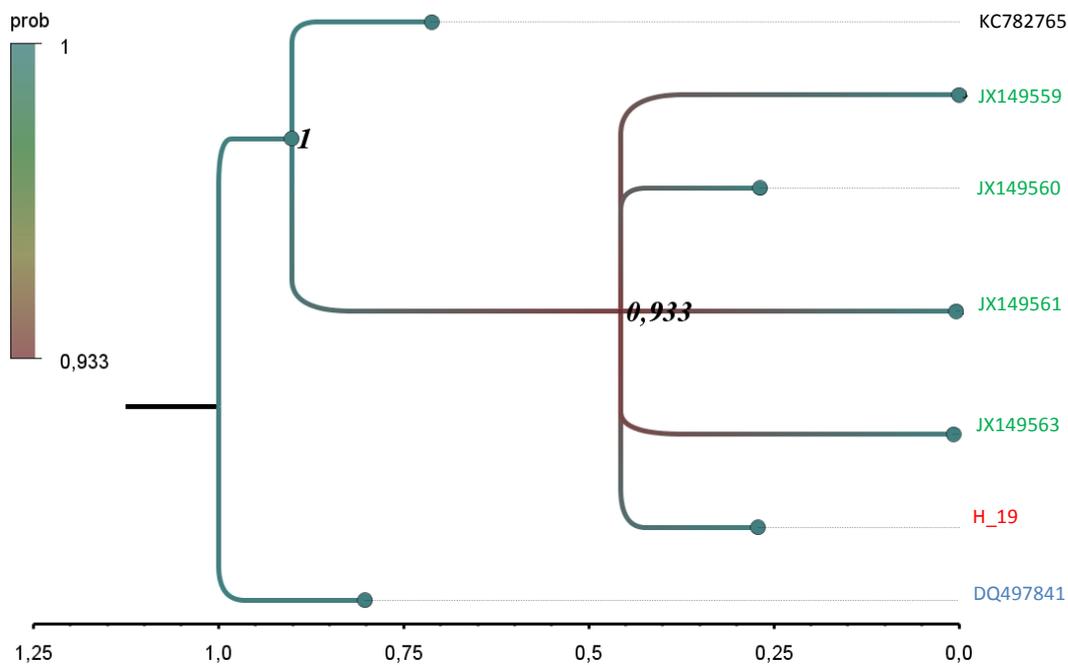
Por sua vez, no banco de dados Cytb\_245 foi observado a existência de doze sítios variáveis os quais formaram doze haplótipos com diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,280 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00121 (Tabela 1). Um maior número de sítios variáveis foi observado entre as amostras do oceano Índico, porém uma baixa divergência genética é evidenciada, sendo no máximo dois sítios variáveis entre quaisquer haplótipos (Tabela 1). Foi observado que nas populações do cobia do Atlântico sul e do oceano Índico há um número maior de haplótipos sendo compartilhados (H\_5 e H\_6).

Formando apenas dois haplótipos o grupo do Atlântico sul apresentou uma diversidade haplotípica e nucleotídica inferior ao observado no grupo do oceano Índico (Cytb\_245;  $H_d = 0,189$ ,  $\pi = 0,00077$  e  $H_d = 0,304$ ,  $\pi = 0,00132$  respectivamente). Não obstante, a AMOVA para as duas populações revelou que 99,87% da variação são atribuídas a espécimes dentro das populações ( $F_{ST} = 0,001$ ,  $p = 0,279$ ), indicando por sua vez, uma alta similaridade gênica entre as duas populações para o fragmento Cytb\_245.

### *3.3. Análise filogenética e filogeográfica das populações naturais do cobia do Atlântico e do oceano Índico.*

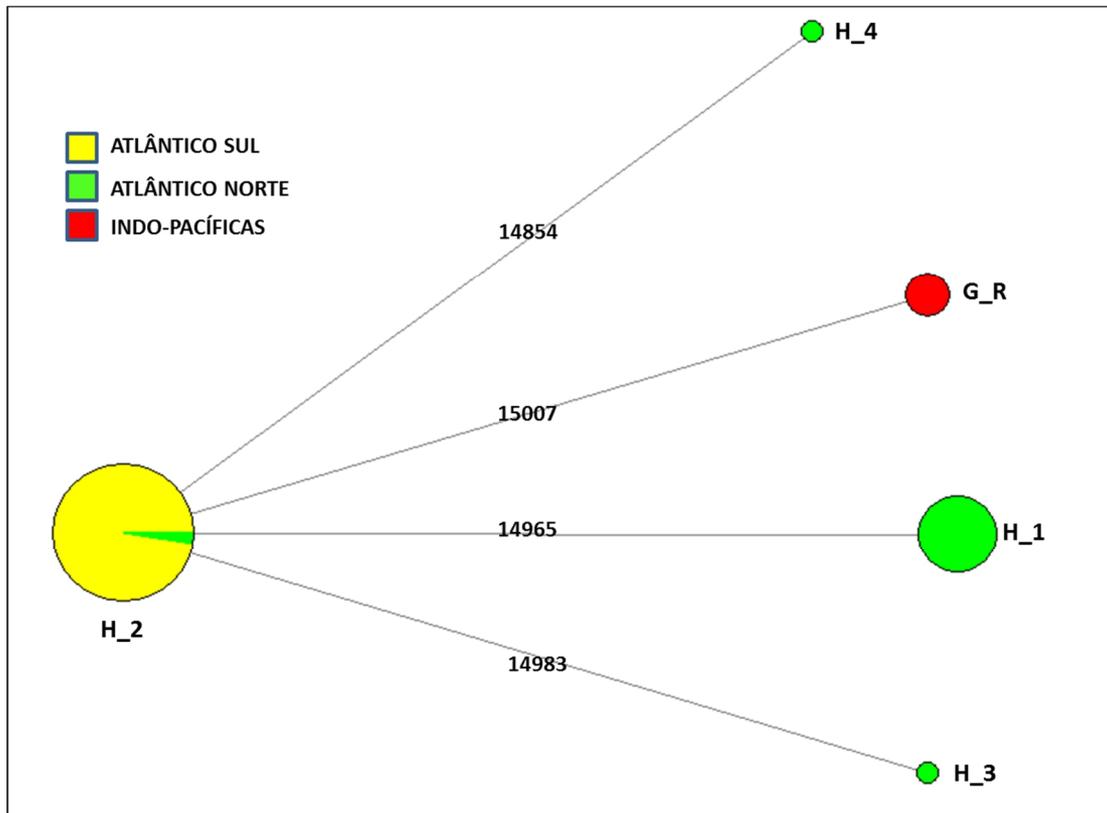
A reconstrução filogenética para cada sequência parcial de nucleotídeos de cada gene/conjunto de dados foi realizada a partir dos haplótipos identificados (Tabela 1). Desta forma, para os conjuntos de dados ATP6, Cytb\_352 e Cytb\_245 foram analisados 12, 7 e 16 haplótipos, respectivamente. A relação dos modelos utilizados para cada reconstrução filogenética, bem como suas características, encontra-se listados no Anexo 1.

O aspecto filogenético encontrado na sequência parcial do gene Cytb (Cytb\_352) trás informações importantes no que tange os aspectos evolutivos do cobia do Atlântico quando comparados com as sequências dos genomas completos (G\_R), de origem Indo-Pacíficas. A reconstrução filogenética da sequência parcial de nucleotídeos do gene Cytb\_352 abrangeu as bacias oceânicas do Atlântico e Indo-Pacíficas. A árvore consenso que melhor representou a filogenia do cobia confirma a maior proximidade filogenética entre os espécimes amostrados no Atlântico, os quais formaram de um grupo monofilético (Figura 1).



**FIGURA 1.** Árvore consenso obtida por inferência Baeynsiana a partir dos haplótipos encontrados nas populações do cobia nas diferentes bacias oceânicas referente à matriz haplotípica Cytb\_352. As topologias tiveram seus nós construídos segundo parâmetros de probabilidade, onde cada um de seus ramos foi estimado de acordo com o seu surgimento. O haplótipo DQ497841 (representado de azul) é o *out-group* de escolha para o gene Cytb nas análises filogenéticas. As bacias oceânicas foram representadas pelas cores de cada haplótipo tal que: vermelho (Atlântico sul), verde (Atlântico norte) e preto (genomas Indo-Pacíficas).

A rede haplotípica gerada a partir das sequências parciais de nucleotídeos do gene Cytb\_352 destaca a formação de um haplogrupo (Figura 2). Dos cinco haplótipos identificados quatro são referentes ao trabalho de Gold (2013) e um é observado nos genomas completos de origem Indo-Pacíficas (G\_R), disponíveis na plataforma GenBank. O haplótipo 2 (H\_2) foi encontrado em todas as sequências parciais de nucleotídeos das amostras do Atlântico sul, sendo observado também em alguns espécimes capturados na costa leste dos EUA. A variação encontrada neste haplótipo na posição 15007 se mostrou típica dos espécimes capturados nos hemisférios norte e sul do Atlântico.



**FIGURA 2.** Rede de haplótipos construída a partir *mtDNA* para o gene *Ctyb\_352* nas populações do cobia amostradas nas regiões litorâneas do nordeste do Brasil, costa leste dos Estados Unidos e regiões Indo-Pacíficas (G\_R). Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência no grupo amostrado no presente estudo. Os números representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo.

## 4. Discussão

### 4.1. Diversidade genética

As informações genéticas contidas no *mtDNA* são importantes na caracterização da diversidade genética, além de oferecerem subsídios para o conhecimento histórico evolutivo das espécies (Solé-Cava, 2001). Estudos genético-populacionais com grupos de animais marinhos, especialmente com peixes, sugerem uma aparente homogeneidade das suas populações (Hauser & Carvalho 2008; Ely *et al.*, 2005 ). Grant e Bowen (1998) sugerem que à ausência de obstáculos ao movimento das correntes oceânicas associado ao alto potencial de dispersão dos peixes marinhos, que ocorrem principalmente durante as formas de ovos planctônicos, larvas ou ainda na fase adulta, podem ser as principais causas biogeográficas e biológicas que levam a este padrão de baixa diferenciação genética entre as populações marinhas.

Os resultados obtidos no presente estudo podem apontar diferentes padrões de diversidade genética dependendo da região mitocondrial analisada. Foi observada uma maior similaridade genética entre os espécimes do cobia encontrados nos hemisférios norte e sul do oceano Atlântico (Cytb\_352;  $F_{ST} = 0,020$ ;  $p = 0,063$ ). O mesmo padrão foi observado entre as populações do Atlântico sul e da Tailândia (Cytb\_245;  $F_{ST} = 0,001$ ;  $p = 0,279$ ). Contudo, uma estruturação genética significativa foi observada quando foram comparadas amostras de cobia do Atlântico sul com amostras Indo-Pacífica (genomas de referência) (Cytb\_352;  $F_{ST} = 0,842$ ;  $p = 0,0001$ ). Este último padrão corrobora os resultados apresentados por Gold *et al.*, em um estudo populacional com o cobia, abrangendo regiões da costa leste dos EUA e regiões costeiras de Taiwan (China, oceano Pacífico). Neste estudo foi observada uma divergência genética significativa entre estas duas populações do cobia, apesar do estilo de vida pelágico da espécie e de sua larga distribuição ao longo dos oceanos (Cytb;  $F_{ST} = 0,623$ ;  $p = 0,0001$ ; Gold *et al.*, 2013).

Tais diferenças de estrutura populacional observada quando diferentes regiões do *mtDNA* são analisadas são esperadas já que cada região pode apresentar diferentes taxas de substituição gênica. Contudo, os padrões observados acima logicamente se refletem na análise qualitativa dos haplótipos observados nos

diferentes oceanos. Desta forma, a maior proximidade gênica observada entre os espécimes dos hemisfério norte e sul do Atlântico, evidenciada através do compartilhamento de haplótipo (H\_2), sugere que os espécimes desta bacia oceânica estão mais relacionados entre si do que quando comparada com os do oceano Índico.

Por sua vez, observamos que o Atlântico norte apresentou maior diversidade de haplótipos (Cytb\_352), sendo alguns observados apenas neste hemisfério do Atlântico (H\_1, H\_3 e H\_4). Contudo, a divergência genética entre o haplótipo mais frequente na população do cobia do Atlântico sul (H\_19) e o haplótipo compartilhado entre os dois hemisférios do Atlântico (H\_2), reside em uma variação nucleotídica simples. Este fato pode ser importante para diferenciação molecular entre as populações do cobia dos dois hemisférios do Atlântico. No entanto, estudos complementares devem ser realizados com espécimes do Atlântico norte dado que, por falta de complementaridade entre as sequências de nucleotídeos, não é possível afirmar que tal haplótipo não ocorra nos espécimes do Atlântico norte.

Uma explicação alternativa para o compartilhamento de haplótipos entre as populações do cobia do Atlântico, observado a partir do gene Cytb\_352, pode estar no curto prazo entre o início e o término do período reprodutivo do cobia encontrado nos dois hemisférios do Atlântico. O período de reprodução no hemisfério norte ocorre entre os meses de abril e setembro, e entre outubro e abril no hemisfério sul do Atlântico (Lotz *et al.*, 1996). A migração para a desova, que ocorre em direção a zona equatorial que possui águas com temperatura mais elevada, ocorre tanto na costa quanto no mar onde as fêmeas liberam várias centenas de milhares de ovos, os quais serão então fertilizados pelos machos presentes.

Por outro lado, a baixa diversidade genética observada entre o cobia do Atlântico sul e do oceano Índico, verificada através do fragmento Cytb\_245, é evidência pela similaridade genética entre os haplótipos mais frequentes em cada população (H\_19 e H\_5, respectivamente). Contudo, a conectividade entre estes dois grupos, observada através do segundo haplótipo mais abundante em cada população (H\_17 e H\_6, respectivamente), pode ser explicada pela eficiência na dispersão larval por meio das correntes oceânicas, fato este que limita a divergência populacional e gera interconexões entre as diferentes bacias oceânicas (Hoarau *et al.*, 2004).

#### 4.2. Inferências sobre a história da população a partir da diversidade genética

Os peixes marinhos podem ser classificados em quatro categorias a partir da combinação entre os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica obtidos com as sequências do *mtDNA* (Grant & Bowen, 1998). Dessa forma, é observado que a população do cobia do Atlântico apresenta baixa diversidade haplotípica e nucleotídica (Cytb\_352;  $H_d = 0,211$  e  $\pi = 0,00063$ , respectivamente). Dado este compatível com a primeira categoria do padrão genético de peixes marinhos, a qual é caracterizado por populações que possuem formação recente, instituídas por efeito bottleneck ou fundador, através de poucas ou algumas linhagens de *mtDNA* (Grant & Bowen, 1998).

Por outro lado, a população do cobia do oceano Índico, representado pela amostragem da região costeira da Índia e da Tailândia, apresentou um número de haplótipos maior que a observada nos espécimes do Atlântico, para os dois genes mitocondriais. Com índice de diversidade haplotípica e nucleotídica relativamente superior aos encontrados no Atlântico a amostragem do litoral da Índia (ATP6;  $H_d = 0,794$  e  $\pi = 0,00241$ ) e da Tailândia (Cytb\_245;  $H_d = 0,304$  e  $\pi = 0,00132$ ) se enquadram melhor na segunda categoria de padrão genético de peixes marinhos, a qual é constituída por populações que podem ter apresentado um rápido crescimento com retenção de novas mutações. Um dos aspectos que fortalecem esta idéia reside na prevalência de um ou dois haplótipos com alta frequência na população (H\_5 e H\_6, respectivamente), sendo incorporados a estes um aglomerado de haplótipos satélites com baixa frequência (em geral uma substituição nucleotídica apenas), formados em sua maioria por uma ou poucas mutações derivadas dos haplótipos centrais. Não se podem descartar outros aspectos que poderiam explicar a manutenção de altos níveis de diversidade haplotípica dentro dessa população, como o tamanho populacional e a heterogeneidade do ambiente, contudo, o presente experimento não tinha informações suficientes para realizar esse teste.

O padrão genético que melhor se enquadra quando comparamos os espécimes das bacias oceânicas do Atlântico e Índico parece ser a terceira categoria de Grant (Grant & Bowen, 1998). A diversidade nucleotídica pronunciada entre os

espécimes do cobia do Atlântico sul com os encontrados na Índia e na Tailândia (ATP6;  $\pi = 0,00121$  e Cytb\_245;  $\pi = 0,00075$ , respectivamente), se mostram relativamente superiores aos encontrados nos espécimes do Atlântico sul (ATP6 e Cytb;  $\pi = 0,00052$ ). Este acréscimo na diversidade nucleotídica associado aos baixos índices de diversidade haplotípica encontrados entre as populações nas diferentes bacias oceânicas (ATP6;  $Hd = 0,303$  para Atlântico sul e Índia, Cytb\_245;  $Hd = 0,280$  para Atlântico sul e Tailândia), pode levar ao entendimento de que há contato secundário entre essas duas populações geograficamente distintas. O compartilhamento de haplótipos entre os espécimes das diferentes bacias oceânicas corroboram para este entendimento. As condições necessárias para manutenção de baixa diversidade haplotípica, tal como o baixo tamanho da população efetiva, parece ser compatíveis com aspectos biológicos do cobia como a maturidade sexual. Sabe-se que nesta espécie a capacidade de reprodução somente é atingida após os primeiros anos de vida, sendo relatada em machos já no primeiro ou segundo ano, enquanto que nas fêmeas é atingida após o segundo ano de vida. Reforçam ainda com esta ideia o modo de vida do cobia, o qual é encontrado comumente isolado ou em pequenos grupos (Shaffer & Nakamura, 1989).

## 5. Conclusões

O presente estudo revisitou a diversidade genética do cobia em diferentes bacias oceânicas a partir de informações contidas no *mtDNA* de espécimes capturadas nas regiões litorâneas do nordeste do Brasil, costa leste dos Estados Unidos e nas regiões costeiras da Índia e da costa oeste Tailândia. De maneira geral, houve uma maior proximidade genética entre as amostras do Atlântico Norte e Sul e uma maior diferenciação destas em relação as amostras Indo-Pacíficas. Tais informações irão subsidiar programas de produção e uso desse pescado na costa brasileira bem como na formação de futuros bancos de germoplasma da espécie.

## 6. Referências

- CARVALHO, G. R., & HAUSER, L. (1994). Genetic impacts of fish introductions: an African perspective. *Species Changes in African Lakes*. Chapman and Hall, London.
- COWEN, R. K. et al. Population connectivity in marine systems. **Oceanography**, v. 20, n. 3, p. 14–21, 2007.
- COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. **Annu. Rev. Mar. Sci**, v. 1, p. 443–66, 2009.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 1, p. 47–50, 2005.
- GOLD, J. R. et al. Population Genetic Comparisons among Cobia from the Northern Gulf of Mexico, U.S. Western Atlantic, and Southeast Asia. **U.S. Western Atlantic, and Southeast Asia North American Journal of Aquaculture**, v. 75, n. 1, p. 57–63, 2013b.
- GONZALEZ, E. G.; ZARDOYA, R. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardinapilchardus*). **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 197, 2007.
- GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 415–426, 1998.
- HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>
- HAMILTON, S.; DOMINGUES, E. C.; CAVALLI, R. O. Desempenho reprodutivo do beijupirá (*Rachycentron canadum*) capturado no litoral de Pernambuco. 2014.
- HOARAU, G. et al. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: a comparison of resolving power between microsatellites and mitochondrial DNA data. **Journal of Sea Research**, v. 51, n. 3-4, p. 183–190, 2004.
- KINLAN, B. P.; GAINES, S. D.; LESTER, S. E. **Propagule dispersal and the scales of marine community process** *Diversity and Distributions*, 2005.

- KOOL, J. T.; MOILANEN, A.; TREML, E. A. Population connectivity: recent advances and new perspectives. **Landscape Ecology**, v. 28, n. 2, p. 165–185, 2012.
- KOSMAN, C. et al. Design and Performance Overview of SeqScape™ Software for Comparative Sequencing Analysis and Mutation Detection. **Human Genetics**, p. 8–8, 2001.
- LESSIOS, H. A.; KESSING, B. D.; PEARSE, J. S. Population Structure and Speciation in Tropical Seas: Global Phylogeography of the Sea Urchin *Diadema*. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 955–975, 2007.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LOTZ, J. M.; OVERSTREET, R. M.; FRANKS, J. S. Gonadal maturation in the cobia, *Rachycentron canadum*, from the Northcentral Gulf of Mexico. **Gulf Research Reports**, v. 9, n. 3, p. 147–159, 1996.
- MUSIKA, J.; KHONGCHATEE, A.; PHINCHONGSAKULDIT, J. Reanalysis and revision of the complete mitochondrial genome of *Rachycentron canadum* (Teleostei, Perciformes, Rachycentridae). **Mitochondrial DNA**, v. 25, n. 4, p. 249–250, 2014.
- PHINCHONGSAKULDIT, J. et al. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: Fisheries management implications. **Aquaculture International**, 2013.
- RAMBAUT, A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. **Institute of Evolutionary Biology University of Edinburgh**, 2009.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; TESLENKO, M. MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. **Manual MrBayes**, p. 1–103, 2011.
- SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of Biological Data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. [s.l.] NOAA Technical Report NMFS 82, FAD Fisheries Synopsis 153, 1989.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Ribeirão Preto, 2001. P. 172-192.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TREML, E. A. et al. Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. **Landscape Ecology**, v. 23, n. SUPPL. 1, p. 19–36, 2008.
- WANG, Z.-D. et al. The Complete Mitochondrial Dna of Cobia (*Rachycentron Canadum*) and Phylogenetics of Carangoid. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 229–237, 2011.

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

WILLIAMS, L. M.; OLEKSIK, M. F. Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. **BMC evolutionary biology**, v. 8, n. 1, p. 282, 2008.

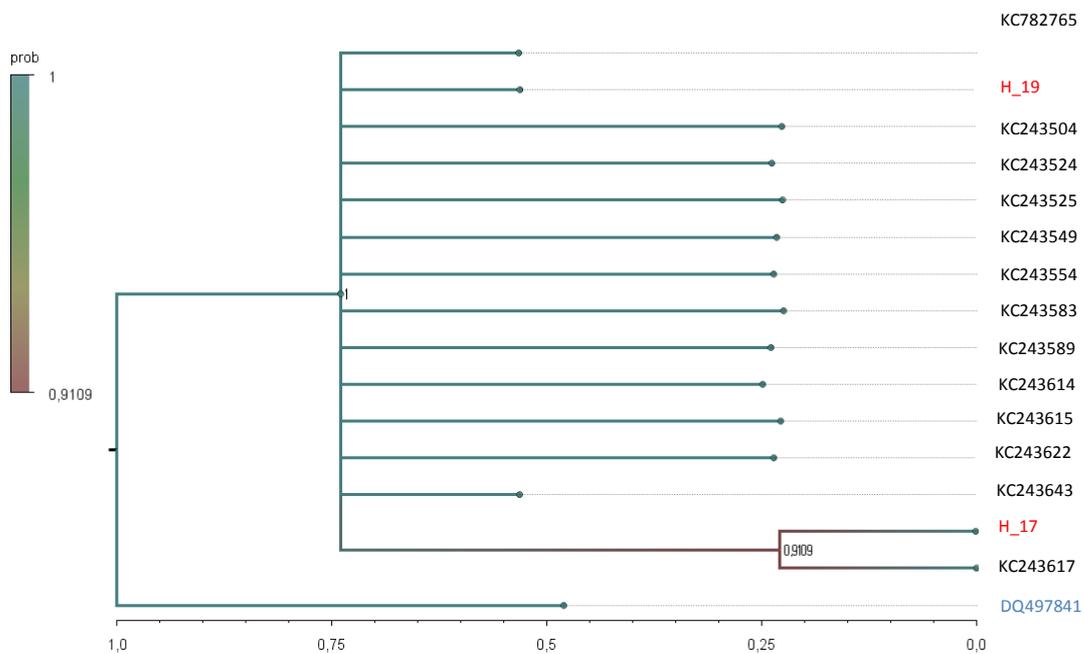
WINNENINCKX, B. DNA Extraction - CTAB Method. **Cell Harvesting**, n. March, p. 14–15, 2009.

## 7. Anexos

**ANEXO 1.** Modelos evolutivos sugeridos para cada conjunto de dados pelo programa Partition Finder.

REGIÃO DO <i>mtDNA</i>	CÓDON	MODELO EVOLUTIVO	CARACTERÍSTICAS
<b>Cytb_352</b>	1°	HKY (Hasegawa, Kishino e Yano)	Diferentes frequências para as bases nucleotídicas. Modelo assimétrico. Cinco parâmetros
	2°	HKY (Hasegawa, Kishino e Yano)	Diferentes frequências para as bases nucleotídicas. Modelo assimétrico. Cinco parâmetros
	3°	JC (Jukes-Cantor)	Mesma frequência para as bases nucleotídicas. Modelo de um parâmetro. Modelo simétrico
<b>Cytb_245</b>	1°	HKY (Hasegawa, Kishino e Yano)	Diferentes frequências para as bases nucleotídicas. Modelo assimétrico. Cinco parâmetros
	2°	JC (Jukes-Cantor)	Mesma frequência para as bases nucleotídicas. Modelo de um parâmetro. Modelo simétrico
	3°	F81 (Felsenstein)	Mesma frequência para as bases nucleotídicas. Modelo de três parâmetros. Modelo assimétrico
<b>ATP6</b>	1°	K80 (Kimura dois parâmetros)	Mesma frequência para as bases nucleotídicas. Dois parâmetros. Modelo simétrico
	2°	HKY (Hasegawa, Kishino e Yano)	Diferentes frequências para as bases nucleotídicas. Modelo assimétrico. Cinco parâmetros
	3°	HKY (Hasegawa, Kishino e Yano)	Diferentes frequências para as bases nucleotídicas. Modelo assimétrico. Cinco parâmetros





**(B).** Árvore consenso obtida por inferência Baeyiana a partir dos haplótipos encontrados nas populações do cobia das diferentes bacias oceânicas, representando a matriz haplotípica Cytb\_245. As topologias tiveram seus nós construídos segundo parâmetros de probabilidade, onde cada um de seus ramos foi estimado de acordo com o seu surgimento. O haplótipo DQ497841 (representado de azul) é o *out-group* de escolha para o gene Cytb nas análises filogenéticas. As bacias oceânicas foram representadas pelas cores de cada haplótipo tal que: vermelho (Atlântico sul), verde (Atlântico norte) e preto (genoma Indo-Pacífica).

## CAPÍTULO 3

# ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO SELVAGEM E DE CULTIVO DO COBIA (*Rachycentron canadum*) NO BRASIL

## Resumo

Foi realizada uma avaliação da estruturação genética do cobia (*Rachycentron canadum*) a partir de marcadores de DNA mitocondrial (*ATP6* e *Cytb*) e de microssatélites. Para tanto, foram analisados dois grupos de espécimes de cobia. O primeiro grupo foi formado por espécimes selvagens (N = 39), coletados na região litorânea do nordeste brasileiro, Piauí e Ceará. O segundo grupo, por sua vez, foi composto por espécimes de cobia provenientes de empresas de cultivo instaladas nos estados da Bahia, Pernambuco e São Paulo (N = 57). Os resultados das análises com *mtDNA* evidenciaram a formação de nove haplótipos ( $Hd = 0,738$  e  $\pi = 0,00118$ ). A maior similaridade gênica foi observada entre os espécimes selvagens ( $F_{ST} = 0,02556$ ;  $p = 0,32432+-0.0433$ ), assim como entre as populações dos sistemas de cultivos de São Paulo e da Bahia ( $F_{ST} = 0,17437$ ;  $p = 0,00901+-0,0091$ ). Contudo, uma baixa diversidade gênica entre os grupos selvagens e de cultivo foi observada ( $F_{ST} = 0,2304$ ;  $p = 0,00$ ). Os marcadores de microssatélites corroboraram com a baixa variabilidade genética entre as populações de vida livre ( $\phi_{st} = -0,05278$ ;  $p = 0,000$ ), porém um maior distanciamento genético entre os sistemas de cultivos de Pernambuco com os estabelecidos em São Paulo e na Bahia ( $\phi_{st} = 0,10878$ ;  $p = 0,00$  e  $\phi_{st} = 0,06395$ ;  $p = 0,00$  respectivamente) tem sido verificado. Entretanto, apesar da baixa diversidade genética observada entre os espécimes naturais e os de cultivo uma estruturação genética (K = 2) tem sido observada na população do cobia.

## 1. Introdução

A diversidade genética, o potencial evolutivo (Borowsky, 2001) e adaptação de uma espécie (Saura et al 2006) tem como arcabouço a variabilidade genética entre as populações. Espécies mantidas em ambientes controlados tem sua variabilidade genética reduzida, devido, sobretudo, aos acasalamentos não aleatórios ou entre indivíduos aparentados geneticamente (endogamia) ou pela utilização de um pequeno número de reprodutores (Moreira, 2001). Fatores intrínsecos à espécie, como a alta

prolificidade, também podem contribuir para a redução da variabilidade genética em sistemas de cultivos. Estes fatores acarretam a homogeneização do componente genético das proles ao longo das gerações, fazendo com que as populações mantidas em sistemas de cultivos se distanciem geneticamente das populações naturais (Pineda-Santis, 2004).

A variabilidade genética encontrada em populações selvagens é, em regra, maior que a encontrada nas populações provenientes de sistemas de cultivo, sobretudo, pelo fato daquelas estarem submetidas a diferentes pressões ambientais (Povh, 2007). Não obstante, é sabido que os sistemas de cultivos tem maior propensão para promover redução da variabilidade genética, e que esta muitas vezes só pode ser recuperada com introdução de novo material gênico (Yokota et al., 2003; Sekino et al., 2004).

Uma das preocupações que tem estimulado estudos a respeito da variabilidade genética em estoques naturais e nos sistemas de cultivos é a perda de alelos importantes (Almeida et al., 2003), que estão associados a processos como: manifestação de fenótipos indesejáveis através da redução da heterozigose (Souza, 2007), redução da capacidade de adaptação local de espécies e interferência na capacidade de resistência às alterações de cunho temporal ou estacional. Estes fatores, por sua vez, podem afetar negativamente a longevidade da espécie.

Desta forma, o conhecimento da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações é um ponto crítico para os sistemas de manejo e conservação de espécies marinhas. Contudo, sabe-se que a variabilidade genética é bastante influenciada por fatores como: o número e a origem do plantel de reprodutores utilizados em sistema de recria, o tipo de manejo reprodutivo e o grau de interação entre as diferentes populações selvagens utilizadas para a formação do plantel de reprodutores. Não são raras as indicações que populações estoques ou grupos isolados, caracterizados por população efetiva pequena, perdem variabilidade por efeito da deriva genética ou pelo aumento na ocorrência de acasalamentos endogâmicos, apresentando, desse modo, menor variabilidade genética que as populações naturais. Exemplo disso tem sido observado em peixes de água doce, onde suas populações, de modo geral, apresentam elevadas taxas de diferenciação genética ocasionada, muitas vezes, pelo isolamento geográfico, o qual tem proporcionado à redução de trocas gênicas, ocasionando elevação das taxas de diferenciação genética

(Ramos, 2007). Por outro lado, os peixes marinhos, por apresentarem grande capacidade de dispersão, tem apresentado baixo grau de diferenciação genética entre as populações (Horau *et al.*, 2004; Grant & Bowen, 1998).

Sabendo da importância da variabilidade genética para programas de melhoramento genético (Falconer, 1987), sobretudo no que tange variabilidade nos estoques de reprodutores entre os diferentes sistemas de cultivo; e tendo em vista, o crescente desenvolvimento da aquicultura em diferentes regiões do globo, e, principalmente, a comercialização de formas juvenis entre os diferentes sistemas de cultivo, torna-se cada vez mais importante o conhecimento da estruturação e dos perfis genéticos de espécimes de cada sistema de cultivo. Espécies com importância comercial, como o cobia (*Rachycentron canadum*), requerem um constante monitoramento dos seus estoques, das suas progênes e das suas populações naturais.

O cobia, *Rachycentron canadum*, tem sido considerado um dos candidatos mais promissores para aquicultura de peixes marinhos no mundo (Benetti; Orhun; Zink, 2007). Iniciada na década de 1990 em Taiwan (Yeh, 2000) a aquicultura do cobia teve a produção das formas juvenis impulsionadas pelos sistemas de cultivo *nearshore* e *offshore* a partir de 1997. Contudo, somente durante a última década houve a tendência de desenvolvimento da aquicultura em regiões tropicais e subtropicais, tendo como destaques os Estados Unidos, Porto Rico e Brasil (Joan Holt; Faulk; Schwarz, 2007).

Diante destas perspectivas, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e a estruturação genética do cobia a partir da análise de marcadores DNA mitocondriais (*mtDNA*) e de microssatélites. Para tanto, foram avaliados espécimes selvagens do cobia, amostrados na região costeira dos estados do Piauí (PI) e do Ceará (CE), e espécimes provenientes de três sistemas de cultivos estabelecidos nos estados de São Paulo (SP), Bahia (BA) e Pernambuco (PE).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Coleta de amostras

Foram utilizadas amostras de tecido (nadadeira, fígado ou músculo) de 97 espécimes de cobia entre animais selvagens (N = 33 do litoral do Piauí e N = 6 do litoral do Ceará) e animais provenientes de sistemas de cultivos de três estados brasileiros:

São Paulo (N = 20), Bahia (N = 28) e Pernambuco (N = 20). As amostras dos espécimes selvagens foram coletadas a partir da faixa litorânea compreendida entre a região do Delta do Parnaíba, na divisa dos Estados do Piauí e do Maranhão, e região litorânea do Estado do Ceará (2°44'07.6"S 41°48'22.9"W a 4°49'52.0"S 37°15'09.2"W), sendo denominadas no presente estudo como amostragens do Piauí e do Ceará, respectivamente. Por sua vez, as amostras de tecidos dos espécimes provenientes dos estados da Bahia, São Paulo e Pernambuco são originárias de sistema de cultivos de três empresas que estão investindo na produção comercial desse espécime, sendo estas: Bahia Pesca S.A., Redemar Alevinos e Aqualíder, respectivamente. As coletas de amostras de tecido nestas empresas foram realizadas conforme a disponibilidade das propriedades e preferências de cada produtor quanto à forma de realização da coleta.

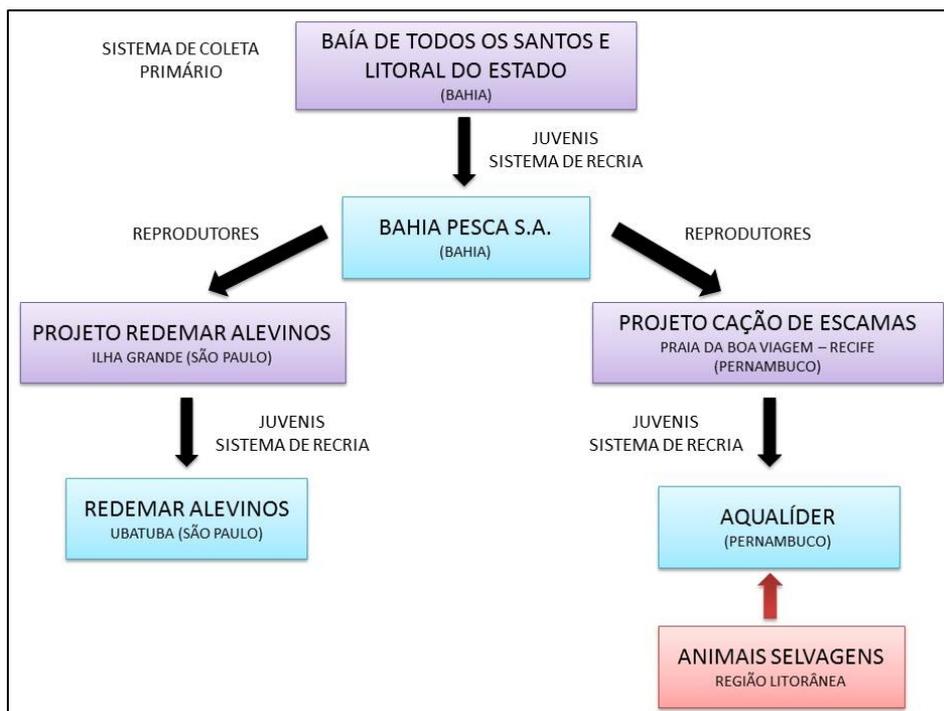
## 2.2. *Plantel de reprodutores dos sistemas de cultivo*

Os produtores da empresa Bahia Pesca S.A. optaram por formar o plantel de reprodutores a partir de indivíduos juvenis, capturados na Baía de Todos os Santos e em alto mar, na região litorânea do estado da Bahia. Atualmente, a empresa Bahia Pesca S.A. possui várias unidades de pesquisa e manejo no Estado, sendo a Fazenda Oruabo, localizado no município de Santo Amaro da Purificação, o local onde ocorrem as principais atividades de pesquisa. Esta unidade é um laboratório de piscicultura marinha onde são realizados os trabalhos de maturação, alevinagem e larvicultura do cobia. Além das atividades de cultivo, a empresa Bahia Pesca S.A. fornece reprodutores para outros sistemas de cultivo do Brasil, como por exemplo, para a Redemar Alevinos e Aqualíder.

Na Redemar Alevinos, localizada no estado de São Paulo, o cultivo ocorre em sistema *nearshore* (próximo à costa) na Praia de Lagoinha em Ubatuba. Os juvenis deste sistema de cultivo foram provenientes da produção comercial da unidade da Redemar Alevinos localizado na cidade Ilha Grande, no mesmo Estado, cujos reprodutores são originalmente da empresa Bahia Pesca.

Por sua vez, o sistema de cultivo da Aqualíder, em Pernambuco, ocorre em *offshore* (alto mar). Os juvenis desta unidade foram coletados no Projeto cação de escamas, cujos exemplares de reprodutores são oriundos do sistema de recria da

empresa Bahia Pesca S.A. No entanto, apesar de receberem exemplares de reprodutores do sistema de cultivo da empresa Bahia Pesca S.A, a empresa Aqualider mantém um plantel de reprodutores misto, formado por exemplares juvenis originários da Bahia Pesca S.A. e por exemplares selvagens, coletados em alto mar na região litorânea de Pernambuco (Figura 1).



**FIGURA 1.** Sistema de cultivo do cobia (*Rachycentron canadum*) de parques aquícolas em três estados brasileiro.

### 2.3. Extração do DNA

O material biológico coletado foi armazenado em microtubos contendo álcool etílico absoluto para a fixação dos tecidos, sendo mantidos sob-refrigeração até o processamento para extração de DNA. De cada amostra de tecido foram utilizadas, aproximadamente, 1cm<sup>3</sup> de material biológico para a extração do DNA total. Esta foi realizada seguindo o protocolo adaptado de Boyce et al. (1989), contendo detergente catiônico CTAB composto por: 100mM Tris-HCl (ph 8,0), 7 mg/ml de NaCl, 0,2 M EDTA, 2% CTAB (hexadecylmatylammonium bromide) e 0,2% de 2-mercaptoetanol. As amostras de DNA extraídas foram diluídas em 50 microlitros de TE estéril (Tris-EDTA ph

8,0). A verificação da concentração do DNA extraído foi feita por espectrofotometria através do aparelho nanodrop (Nanodrop ND1000).

#### 2.4. Amplificação do DNA mitocondrial e sequenciamento

Duas regiões do DNA mitocondrial foram amplificadas por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), são elas: a adenosinatrifosfatase subunidade 6 (ATP6) e o citocromo b (Cytb). O primeiro gene foi amplificado com os iniciadores H9076-ATP (5' GGG CGG ATA AAK AGG CTA AT 3') e o L8343 - LYS (5'AGC GTT GGC CTT TTA AGC TAA WGA TWG GTG 3') (Wang et al., 2011), enquanto o segundo gene foi amplificado pelo par de iniciadores H 15915-THR (5' ACC TCC GAT CTY CGG ATT ACA AGA 3') e o L 14734-GLU (5'AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT 3') (Wang et al., 2011). As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2  $\mu$ M de cada iniciador, 2,5mM dNTP, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq Polymerase* (Promessa®), 3ng de DNA, tampão 1X em um volume final de 10 $\mu$ l. Os parâmetros do termociclagem que foram utilizados são: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 90 segundos a 56°C e 90 segundos a 72°C, e um passo final de 7 minutos a 72°C. Para detecção de falsos positivos foi incluída uma reação controle realizada sem adição de DNA (controle negativo). O sucesso nas amplificações foi verificado pela visualização em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo. O marcador de peso molecular de 1kb Plus (Invitrogen) foi utilizado para verificar se de fato houve amplificação dos fragmentos esperados. A eletroforese foi realizada em uma voltagem de 120 volts por tempo variável de acordo com o tamanho dos fragmentos, sendo os géis de agarose analisados em equipamento *Eagle Eye<sup>TM</sup> II (Stratagene)*. Os produtos amplificados foram purificados com 1 $\mu$ l de ExoSAP-IT® (USB® Product Affymetrix) a 37°C por 30 minutos, seguido de aquecimento a 80°C por 20 minutos. Posteriormente, a reação de sequenciamento foi realizada seguindo o protocolo do *kit BigDye® v.3 (Applied Biosystems)*.

As reações de seqüenciamento foram purificadas com 3 $\mu$ l de EDTA a 125mM e 25 $\mu$ l de etanol a 100% e posterior centrifugação à 4°C por 30 minutos à 3.000 rpm. Uma segunda etapa foi realizada adicionando 30 $\mu$ l de etanol 70% e posteriormente sendo finalizada com uma centrifugação à -4°C por 15 minutos à 3.000 rpm. A solução foi descartada e o DNA foi ressuspenso com 10 $\mu$ l de formamida Hi-Di. A eletroforese

capilar da reação de sequenciamento foi realizada no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems).

### 2.5. Genotipagem com *microsatélites*

A genotipagem foi realizada com 20 locos de *microsatélites* (Anexo 1), previamente descritos na literatura para a espécie em estudo (WANG et al., 2011), os quais foram selecionados considerando o seu sucesso em análises de diversidade genética e conteúdo de informação polimórfica. As amplificações dos *loci* de *microsatélites* foram realizadas em sistema de multiplex com o *kit* Qiagen® Q Solution. Os reagentes que foram utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA são: PCR Mix (50%), tampão Q Solution (10%), 0,2µl de cada *primer* a 10µM; 1,5µl de DNA a 3ng/µl e água livre de RNase para um volume final de 10µl.

Os pares de iniciadores foram agrupados em quatro grupos (BM1, BM2, BM3 e BM4) de acordo com o seu tamanho e fluorescência. Os parâmetros de amplificação no termociclador seguiram o seguinte protocolo: ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos, ciclos de desnaturação a 95°C por 5 minutos, anelamento dos *primers* por 90 segundos à 54 °C e extensão à 72°C por 90 segundos, e uma extensão final dos produtos à 72°C por 30 minutos. O número de ciclos de desnaturação foi de 35 vezes.

Para verificação do sucesso das amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 2% corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com o equipamento EagleEye II – Stratagene®. A genotipagem foi realizada utilizando 1,5ul de produto do multiplex, com 1ul de ROX e 7,5ul de formamida (Hi-Di), sendo o produto levado ao termocicladores para desnaturação (95°C por 5 minutos), seguido de choque térmico em gelo. Os produtos foram genotipados no sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems) e analisados com programa GeneMapper v.4.0 (Chatterji; Pachter, 2006).

## 2.6. Análise de sequências de DNA

As sequências de nucleotídeos geradas para as duas regiões do *mtDNA* foram analisadas por meio do programa SeqScape versão 2.5 Applied Biosystems (Kosman et al., 2001). Adicionalmente, como forma de subsidiar as análises com as sequências de nucleotídeos, foram realizados *blast* das sequências biológicas primárias do cobia na plataforma GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O genoma utilizado como referência (G\_R) nas análises teve origem a partir de amostra coletada na China (NC011219).

Deste modo, as sequências de nucleotídeos foram alinhadas ao genoma de referência (G\_R) por meio do algoritmo *Clustal W* (Hall, 1999) no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Em seguida, cada conjunto de dado (matrizes da ATP6 e do Cytb) passou por um processo de pareamento das sequências de nucleotídeos para as duas regiões gênicas, de acordo como o espécime que lhe deu origem, sendo descartadas aquelas sequências que não apresentaram um resultado satisfatório para alguma região gênica. Desta forma, o número de espécimes que participaram desta etapa, formando a matriz de nucleotídeos do *mtDNA*, foi reduzido a 86 sequências de pares de bases (pb). A análise da matriz de nucleotídeos foi realizada a partir da execução das seguintes etapas:

- a. Identificação de sítios polimórficos, composição nucleotídica e diversidade haplotípica usando os programas DNAsp versão 5 (Librado; Rozas, 2009) e Arlequin versão 3.0 (Excoffier; Laval; Schneider, 2005); e
- b. Análise da relação entre os haplótipos identificados por meio da construção de rede haplotípica com o programa Network versão 4.1.1.2, usando o método *Median-Joining* (Bandelt; Forster; Röhl, 1999).

## 2.7. Análise populacional

As populações selvagens do cobia foram comparadas com os espécimes dos sistemas de cultivos através das seguintes etapas:

- a. Estimativa da divergência genética entre as populações por meio do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) par-a-par e sua significância por meio de

1.000 permutações como o programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier; Laval; Schneider, 2005); e

b. Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizada para verificar a proporção da variação genética dentro e entre as populações do cobia com o programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier; Laval; Schneider, 2005).

## 2.8. Análise de dados de genotipagem

Para avaliar se os locos selecionados encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e se não estão em desequilíbrio de ligação foram utilizados diferentes testes estatísticos disponíveis no pacote Genepop (Rousset, 2008). Todos os loci que apresentaram desvio do EHW foram testados para alelos nulos e/ou *dropout* para afastar falsos homocigotos pelo software Micro-checker (Van Oosterhout et al., 2004). O software GDA (Labate, 2000) foi utilizado para calcular o número médio e a frequências dos alelos em cada loco. A estimativa de heterozigosidade observada ( $H_o$ ), a esperada ( $H_e$ ) e a total ( $H_t$ ), bem como a diversidade genética entre as populações ( $D_{st}$ ) e a proporção da diversidade total entre as populações ( $G_{st}$ ) para cada grupo de espécimes selvagens e de sistemas de cultivo foram realizadas utilizando o programa Fstat v.4.2.1 (Goudet, 2013). Para estimar a proporção relativa de variações genética dentro e entre as populações foi realizada análise de variância molecular (AMOVA) no programa Genalex v.6.5 (Peakall; Smouse, 2012). Por fim, os valores destas estimativas obtidas para os cultivos foram comparados com os estimados para as populações naturais.

## 3. Resultados

### 3.1. Diversidade genética do cobia a partir de dados do mtDNA

Foram analisadas 1525pb compreendidos em duas regiões do mtDNA (ATP6 e Cytb). No gene ATP6, analisados a partir de sequências de nucleotídeos com 437pb localizados entre as posições 8118 a 8554 do genoma completo, foram identificados três sítios variáveis que formaram o mesmo número de haplótipos, com uma

diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,184 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00091. Este gene se mostrou bastante conservado, sendo que 88,36% dos espécimes amostrados apresentaram similaridade molecular com o genoma de referência ( $G_R$ ) para esta região do *mtDNA*. Contudo, cerca de 30% das amostras coletadas no estado da Bahia apresentaram um haplótipo diferenciado, possuindo mutações em sítios específicos (8295 e 8462), as quais não foram observadas nos demais espécimes.

No gene *Cytb*, as sequências de nucleotídeos formadas por 1088pb estabelecidos entre as posições 14432 a 15519 do genoma, foram identificados oito sítios variáveis que formaram sete haplótipos, com uma diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,673 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00128. Dos sítios variáveis observados neste gene apenas o sítio localizado na posição 15134 do genoma apresentou polimorfismo comum a todos os espécimes analisados, tanto no grupo dos espécimes selvagens como no de cultivo.

Nos dois genes concatenados foram observados onze sítios variáveis que formaram dez haplótipos com uma diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,738 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00118. Dos haplótipos formados nove foram encontrados entre os espécimes selvagens e de cultivo (Tabela 1). Os haplótipos encontrados apresentaram uma distribuição assimétrica entre as populações de espécimes selvagens e as de cultivo, de tal modo que, quatro haplótipos foram encontrados apenas em espécimes de cultivo ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_5$  e  $H_6$ ), e outros quatro foram encontrados apenas em animais selvagens ( $H_4$ ,  $H_7$ ,  $H_8$  e  $H_9$ ). O haplótipo com maior frequência entre os espécimes selvagens ( $H_3$ ) também foi encontrado no sistema de cultivo de São Paulo, correspondendo a 20% de sua amostragem. Contudo, este haplótipo não foi encontrado em outros sistemas de cultivo. Por outro lado, o haplótipo que apresentou maior frequência dentre os espécimes de cultivo ( $H_2$ ), não foi encontrado na amostragem selvagem. Apesar de possuir distribuição distinta dentre os grupos de espécimes selvagens e de cultivo, os haplótipos com maior frequência em cada grupo possuem baixa diversidade nucleotídica entre si (apenas um sítio polimórfico).

**TABELA 1.** Haplótipos (H) identificados para os genes mitocondriais nas populações de cobia (*Rachycentron canadum*) amostradas neste estudo, a posição das substituições observadas e frequência dos haplótipos nas populações estudadas.

		ATP6			CYTB							FREQUENCIA DOS HAPLÓTIPOS NOS LOCAIS AMOSTRADOS					
		8	8	8	4	4	4	4	4	5	5	5					
HAPLÓTIPOS		2	2	4	6	6	6	8	9	1	1	2					
		3	9	6	4	5	7	5	6	3	7	9					
		1	5	2	2	7	2	2	3	4	3	0					
		SELVAGENS		CULTIVO													
		CE	PI	SP	BA	PE											
NC 011219	G_R	G	G	T	C	T	T	T	T	A	G						
COBIA	H_1	.	A	A	.	.	.	C	C	.	.	-	-	-	9	-	
COBIA	H_2	.	.	.	.	.	.	C	C	G	.	-	-	16	18	-	
COBIA	H_3	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	5	18	4	-	-	
COBIA	H_4	A	.	.	.	.	C	.	C	C	.	1	-	-	-	-	
COBIA	H_5	.	.	.	T	.	.	C	.	C	.	A	-	-	-	8	
COBIA	H_6	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	A	-	-	-	1	
COBIA	H_7	.	.	.	.	.	.	C	C	.	A	-	3	-	-	-	
COBIA	H_8	.	.	.	.	C	.	.	C	C	.	.	-	2	-	-	
COBIA	H_9	.	.	.	.	.	C	.	C	C	.	.	-	1	-	-	
<b>TOTAL</b>		<b>6</b>		<b>24</b>			<b>20</b>		<b>27</b>		<b>9</b>						

Os haplótipos formados no grupo de espécimes coletados no estado da Bahia se apresentaram como os mais diversos dentre os haplótipos formados dentro de cada população (no máximo três sítios variáveis). Por outro lado, os espécimes coletados no estado de Pernambuco apresentaram a menor número de sítios polimórficos entre os haplótipos formados (no máximo de um sítio polimórfico). Nestes sistemas de cultivo, Bahia e Pernambuco, foram encontrados os haplótipos que se mostraram mais diversos (máximo seis sítios variáveis) entre todas as populações analisadas.

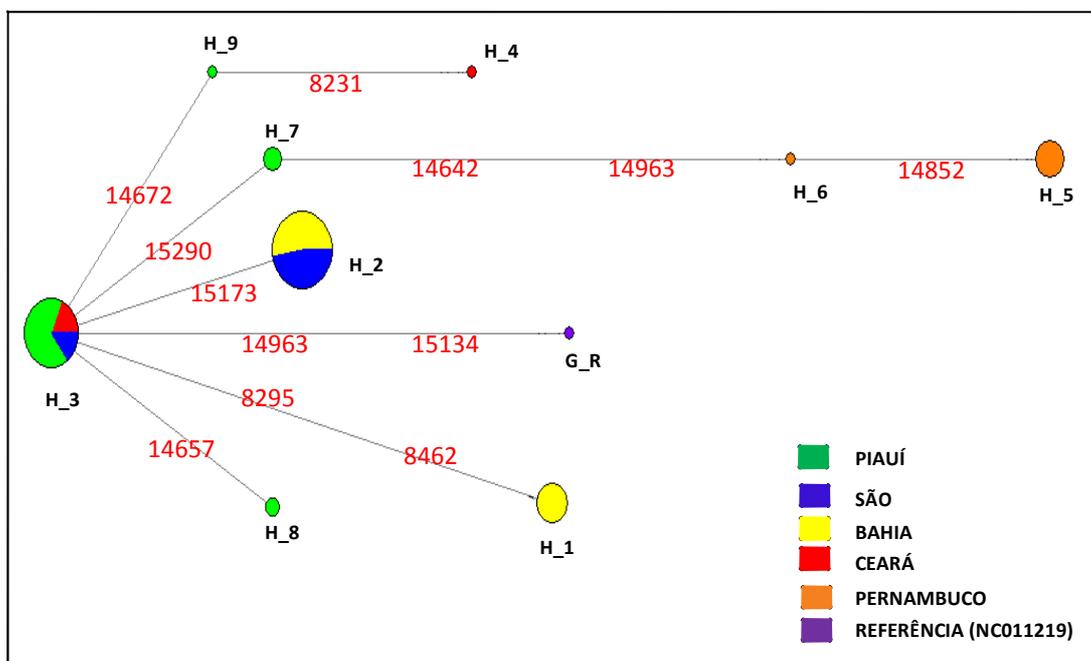
A Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir dos grupos formados por espécimes selvagens e os provenientes dos sistemas de cultivo indicou uma diversidade gênica entre os espécimes destes dois grupos ( $F_{ST} = 0,2304$ ;  $p = 0,00$ ). Contudo, a AMOVA realizada par-a-par, sem a diferenciação entre os espécimes selvagens e os provenientes dos sistemas cultivo, indicou que 34,05% da diversidade genética são encontradas entre as populações dentro dos grupos do presente estudo.

As populações de espécimes selvagens (PI e CE) indicaram alta similaridade gênica ( $F_{ST} = 0,02556$ ;  $p = 0,32432+0,0433$ ), assim como as populações dos sistemas de cultivos de São Paulo e Bahia ( $F_{ST} = 0,17437$ ;  $p = 0,00901+0,0091$ ) (Tabela 2). Contudo, os espécimes do sistema de cultivo de Pernambuco (PE) se mostraram como os mais diversos dentre as populações analisadas, apresentando valores significativos de divergência gênica como as demais populações analisadas ( $F_{ST} > 0,79745$ ;  $p = 0,00000+0,0000$ ) (Tabela 2).

**TABELA 2.** Valores de  $F_{ST}$  (diagonal inferior) entre pares de populações de cobia (*Rachycentron canadum*) a partir das sequências de nucleotídeos do *mtDNA*. Valores de  $p$  (diagonal superior) com nível de significância igual a 0,05.

	SELVAGEM		CULTIVO		
	CEARÁ	PIAUÍ	PERNAMBUCO	SÃO PAULO	BAHIA
CEARÁ	*	0,32432+0,0433	0,00000+0,0000	0,00000+0,0000	0,01802+0,0121
PIAUÍ	0,02556	*	0,00000+0,0000	0,00000+0,0000	0,00000+0,0000
PERNAMBUCO	0,90604	0,89675	*	0,00000+0,0000	0,00000+0,0000
SÃO PAULO	0,61638	0,61137	0,93568	*	0,00901+0,0091
BAHIA	0,31850	0,40603	0,79745	0,17437	*

A rede de haplótipos obtida a partir da matriz de nucleotídeos demonstra a relação entre os diversos haplogrupos formados, bem como evidência a proximidade genética entre os dois principais haplogrupos formados entre os espécimes de cultivo e os selvagens, H\_2 e H\_3 respectivamente (Figura 2).



**FIGURA 2.** Rede de haplótipos construída a partir *mtDNA* para os genes *ATP6* e *Ctyb* nas populações do cobia amostradas em cinco estados do território brasileiro e da sequência do genoma completo disponível no GenBank. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência no grupo amostrado no presente estudo. Os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo.

### 3.2. Diversidade genética do cobia a partir de loci de microssatélites

Dos 20 loci selecionados, 15 se apresentaram polimórficos para todas as populações, enquanto apenas cinco (E02, D11, C04, F10 e B12) foram monomórficos em algumas das populações analisadas (Anexo 2). Nos espécimes selvagens coletados no estado do Ceará foi observado o menor número de locos polimórficos, enquanto os espécimes coletados no sistema de cultivo da Bahia apresentaram polimorfismo em todos os vinte loci. Os espécimes de cultivo, com exceção dos amostrados na Bahia, apresentaram o mesmo locos monomórfico (F10), porém este também tem sido observado nos animais coletados no Ceará (Anexo 2).

A heterozigidade observada em cada locos, calculada a partir do grupo de espécimes do cobia abrangendo os animais selvagens e os de cultivo, foi em média inferior a heterozigidade total ( $H_o = 0,562 / H_t = 0,615$ ). E de modo geral, os loci que contribuíram para a diversidade total encontrada entre os grupos de espécimes do

cobia (B12, G05 e D11) foram também os que apresentaram os maiores coeficientes de endogamia intrapopulacional ( $Gst'$ ) (Tabela 3).

**TABELA 3.** Estimativa de heterozigose por Nei's fornece a  $H_o$  (Heterozigose observada),  $H_s$  (Divergência genética dentro das populações),  $H_t$  (Heterozigose total),  $Dst$  (divergência genética entre populações),  $Gst$  (Proporção da diversidade total que está entre as populações) e  $Gst'$  (coeficiente de endogamia intrapopulacional).

Locos	$H_o$	$H_s$	$H_t$	$Dst$	$Gst$	$Gst'$
H10	0.837	0.694	0.732	0.038	0.052	0.064
A10	0.628	0.566	0.600	0.034	0.057	0.071
E08	0.958	0.761	0.777	0.015	0.020	0.025
C06	0.683	0.880	0.912	0.032	0.035	0.044
H08	0.650	0.825	0.858	0.032	0.038	0.047
H09	0.240	0.439	0.440	0.001	0.003	0.004
E02	0.097	0.090	0.094	0.004	0.038	0.048
E04	0.400	0.504	0.521	0.017	0.032	0.040
A04	0.785	0.624	0.666	0.042	0.063	0.078
D11	0.222	0.255	0.293	0.038	0.130	0.157
A11	0.951	0.653	0.693	0.040	0.058	0.072
C04	0.199	0.189	0.204	0.015	0.072	0.089
G05	0.174	0.748	0.864	0.116	0.134	0.162
F06	0.777	0.845	0.909	0.065	0.071	0.087
D10	0.935	0.905	0.936	0.031	0.034	0.042
F10	0.014	0.086	0.086	0.000	0.004	0.005
E06	0.758	0.698	0.741	0.042	0.057	0.070
B12	0.286	0.399	0.472	0.073	0.155	0.186
H01	0.908	0.840	0.875	0.035	0.040	0.050
E11	0.732	0.591	0.622	0.031	0.050	0.062
Todos loci	0.562	0.580	0.615	0.035	0.057	0.070

### 3.3. Estrutura genética intra e interpopulacional

Os espécimes amostrados no estado do Piauí apresentaram o maior número médio de alelos ( $N_a = 6,4$ ) dentre os grupos analisados. Não obstante, este grupo também apresentou o maior número de alelos ( $N = 29$ ), os quais foram observados em oito loci (D11, A11, C04, F06, F10, E06, B12 e E11) dentre os vinte loci analisados no presente estudo (Anexo 3). Os grupos de espécimes de Pernambuco e do Ceará, por

sua vez, apresentaram o menor número médio de alelos diferentes ( $N_{a_{PE}} = 3,5$  e  $N_{a_{CE}} = 3,85$ ). De modo geral, o locus D10 foi o que contribuiu com o maior número de alelos diferentes ( $N_a$ ) em cada grupo do cobia analisado, com exceção do grupo de amostragem do estado da Bahia, na qual este locus foi precedido pelo locus F06 (Anexo 3). Contudo, o número médio de alelos efetivos encontrado em cada população do cobia, entre os espécimes selvagens e de cultivo, próximo à média total ( $N_e = 3,2$ ) (Tabela 4).

**TABELA 4.** Variação alélica em loci de microssatélites em cada uma dos grupos de espécimes de cobia (*Rachycentron Canadum*). Estimativa de número de alelos diferentes ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), heterozigose observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ) e índice de fixação ( $F$ ).

	<b>Pop</b>	<b><math>N_a</math></b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b>F</b>
SELVAGEM	<b>CE</b>	3,85	3,134	0,609	0,519	-0,184
	<b>PI</b>	6,4	3,769	0,547	0,584	0,091
CULTIVO	<b>PE</b>	3,5	2,602	0,528	0,502	-0,072
	<b>SP</b>	5,6	3,278	0,582	0,572	-0,004
	<b>BA</b>	5,95	3,301	0,542	0,577	0,106
	<b>MÉDIA</b>	5,06	3,217	0,562	0,551	-0,005

De modo geral, os grupos de espécimes amostrados em cada região, tanto entre os animais selvagens como os provenientes de sistema de cultivo, apresentaram uma heterozigose próxima à esperada ( $H_o = 0,562$  /  $H_e = 0,551$ ) (Tabela 4), sendo considerados em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, apenas os grupos de espécimes do Piauí e da Bahia mostraram-se com excesso de homozigotos ( $F_{BA} = 0,106$  e  $F_{PI} = 0,091$ ). Por outro lado, os espécimes dos sistemas cultivos de Pernambuco e de São Paulo apresentaram-se como os mais heterozigóticos ( $F_{PE} = -0,072$  e  $F_{SP} = -0,004$ ) (Tabela 4).

A população do cobia, sem a distinção de espécimes selvagens ou de cultivo, apresentou uma relativa taxa de endogamia ( $F_{IS} = 0,021$ ) (Tabela 5). Contudo, metade dos loci analisados (H10, A10, E08, E02, A04, A11, D10, E06, H01 e E11) indica

existência de variabilidade genética entre as populações, uma vez que existe um maior número de heterozigotos. A análise intrapopulacional, por sua vez, refletiu a endogamia entre os espécimes dentro de cada grupo, com exceção da população do Ceará que mostrou que os espécimes utilizados possivelmente não são aparentados ( $F_{IS} = -0,053$ ) (Tabela 6).

**TABELA 5.** Estimativa de fluxo de genes (Nm) para cada loci e estimativas da porção da variação total das populações (Fit), endogamia devido ao sistema reprodutivo (Fis) e porção da variação total encontrada entre todas as populações (Fst).

Todas as Populações	Locos	Fis	Fit	Fst	Nm
	<b>H10</b>	-0,247	-0,151	0,077	2,994
	<b>A10</b>	-0,152	-0,053	0,086	2,666
	<b>E08</b>	-0,298	-0,241	0,044	5,43
	<b>C06</b>	0,173	0,243	0,085	2,702
	<b>H08</b>	0,172	0,235	0,076	3,021
	<b>H09</b>	0,413	0,447	0,059	4,022
	<b>E02</b>	-0,145	-0,051	0,082	2,795
	<b>E04</b>	0,153	0,222	0,081	2,834
	<b>A04</b>	-0,307	-0,186	0,092	2,456
	<b>D11</b>	0,085	0,237	0,166	1,259
	<b>A11</b>	-0,493	-0,379	0,076	3,026
	<b>C04</b>	-0,095	0,019	0,104	2,15
	<b>G05</b>	0,745	0,795	0,197	1,021
	<b>F06</b>	0,034	0,138	0,107	2,087
	<b>D10</b>	-0,077	-0,007	0,065	3,585
	<b>F10</b>	0,819	0,836	0,094	2,416
	<b>E06</b>	-0,147	-0,034	0,098	2,289
	<b>B12</b>	0,225	0,387	0,208	0,951
	<b>H01</b>	-0,144	-0,049	0,083	2,752
	<b>E11</b>	-0,296	-0,187	0,085	2,701
<b>MÉDIA</b>		0,021	0,111	0,098	2,658

**TABELA 6.** Déficit de heterozigotos dentro das subpopulações (Fis) calculada em cada loco.

	SELVAGEM		CULTIVO		
	CE	PI	PE	SP	BA
<b>H10</b>	-0.282	-0.189	-0.258	-0.296	-0.019
<b>A10</b>	-0.714	-0.062	-0.026	-0.143	0.338
<b>E08</b>	-0.395	-0.364	-0.113	-0.262	-0.187
<b>C06</b>	-0.111	0.510	0.178	0.290	0.266
<b>H08</b>	0.057	0.120	0.683	0.190	0.105
<b>H09</b>	0.385	0.380	0.382	0.636	0.633
<b>E02</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.026
<b>E04</b>	0.294	0.139	-0.077	0.094	0.484
<b>A04</b>	-0.125	-0.192	-0.400	-0.284	-0.280
<b>D11</b>	0.000	0.452	-0.067	-0.030	-0.286
<b>A11</b>	-0.250	-0.301	-1.000	-0.388	-0.519
<b>C04</b>	0.000	0.359	0.000	-0.333	0.041
<b>G05</b>	0.750	0.733	0.800	0.891	0.694
<b>F06</b>	-0.111	0.129	0.273	-0.184	0.315
<b>D10</b>	-0.017	0.005	0.020	-0.089	-0.086
<b>F10</b>	0.000	0.773	0.000	0.000	1.000
<b>E06</b>	-0.143	-0.130	-0.358	0.191	-0.052
<b>B12</b>	0.000	-0.077	0.229	0.338	0.347
<b>H01</b>	-0.091	0.152	-0.287	-0.129	-0.082
<b>E11</b>	-0.333	-0.375	-0.333	-0.059	-0.212
<b>MÉDIA</b>	-0.053	0.085	0.012	0.014	0.081

A análise de variância molecular (AMOVA), realizados a partir dos marcadores de microssatélites, demonstrou uma baixa diversidade genética entre os espécimes do cobia, sendo grande parte dessa diversidade (95,1%) encontrada entre espécimes dentro do grupo de amostragem do cobia ( $\phi_{st} = 0,04904$ ;  $p = 0,000$ ). A baixa diversidade genética também foi evidenciada ao se comparar o grupo formado por espécimes selvagens com o grupo formado pelos espécimes provenientes dos sistemas de cultivo (0,92%), demonstrando a baixa estruturação genética ( $\phi_{st} = 0,07231$ ;  $p = 0,000$ ) (Tabela 7).

A análise da variação genética total demonstrou que os animais selvagens possuem baixa diferenciação genética entre si ( $\phi_{st} = -0,05278$ ;  $p = 0,99099$ ). Porém, uma diferenciação moderada é observada quando os espécimes selvagens são comparados com os espécimes do sistema de cultivo, sendo a maior diferenciação genética encontrada entre os espécimes amostrados no estado do Piauí e de Pernambuco ( $\phi_{st\ PI/PE} = 0,10156$ ;  $p = 0,000$ ) (Tabela 7).

Embora tenham apresentado uma moderada diferenciação genética em relação aos espécimes selvagens, os animais do sistema de cultivo de São Paulo apresentaram maior proximidade genética com os espécimes da Bahia ( $\phi_{st\ BA/SP} = 0,04879$ ;  $p = 0,000$ ), enquanto que os espécimes amostrados em Pernambuco se mostraram como os mais diferenciados dentro do grupo dos animais de cultivo (Tabela 7).

**TABELA 7.** Valores de  $\phi_{st}$  (diagonal inferior) entre pares de populações de cobia em todos os *loci*. Valores de  $p$  (diagonal superior). Valores significativos ( $P < 0,05$ ).

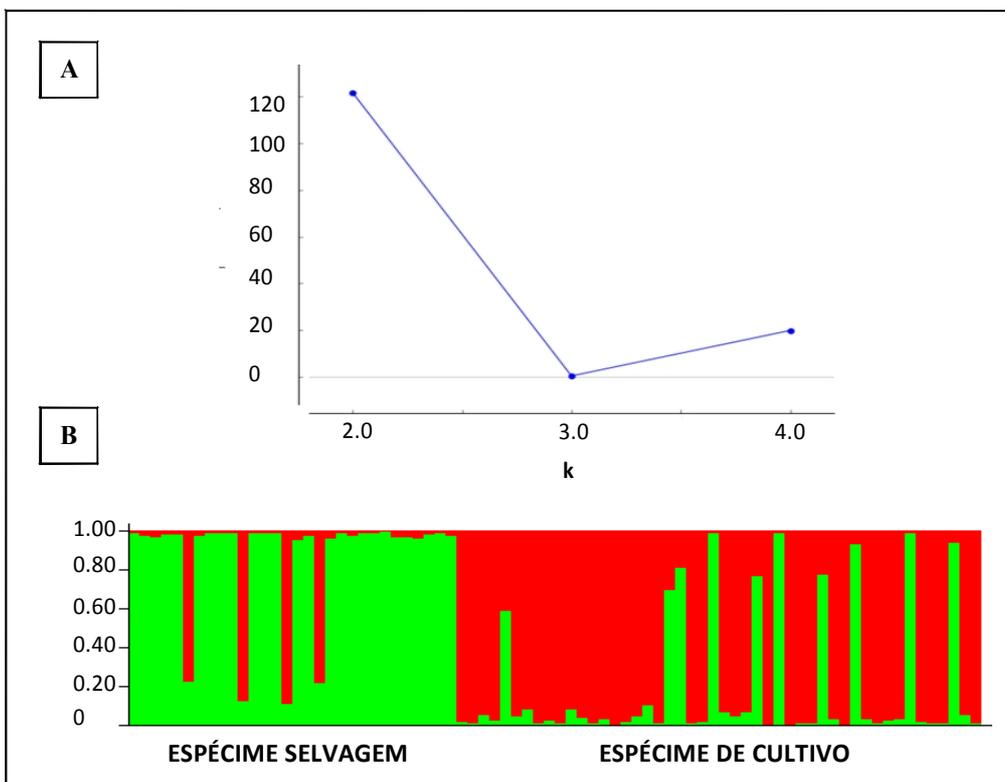
	SELVAGEM		CULTIVO		
	CEARÁ	PIAUI	PERNAMBUCO	SÃO PAULO	BAHIA
CEARÁ	*	0,99099	0,00901	0,00000	0,20721
PIAUI	-0,05278	*	0,00000	0,00000	0,00000
PERNAMBUCO	0,03971	0,10156	*	0,00000	0,00000
SÃO PAULO	0,05963	0,05493	0,10878	*	0,00000
BAHIA	0,01142	0,03407	0,06395	0,04879	*

### 3.4. Análise de estrutura genética

Com intuito de diminuir os vieses nas estimativas de estruturação genética da população do cobia as análises de estruturação levaram em consideração dois pontos:

1. Como foi demonstrado nas análises feitas com o *mtDNA*, bem como nos microssatélites, o grupo de espécimes selvagens possuem baixa diversidade genética entre si, de tal forma que passam a constituir, nas análises de estruturação genética, um único grupo denominado: espécime selvagem;
2. Por sua vez, os animais de Pernambuco por se apresentarem como os mais distintos entre os animais de cultivo e, principalmente, por não possuírem um plantel de reprodutores de origem definida, foram retirados das análises de estruturação. Desse modo, o grupo formado por espécimes provenientes dos sistemas de cultivo de São Paulo e Bahia passaram a constituir, nesta análise, o grupo de espécime de cultivo.

Os resultados da análise de agrupamento Baysiana executada no programa Structure indicaram o valor ótimo de  $K = 2$ . Este valor apresentou o menor desvio padrão indicando que é o valor mais provável para o agrupamento dos dados genotípico em estudo (Figura 3).



**FIGURA 3.** (A) Valores de  $\Delta K$  para cada valor de  $K$ , calculado de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005), onde o maior valor de  $\Delta K$  corresponde ao  $K$  ótimo. (B) Gráfico representando a melhor estruturação genética para a população de cobia amostrados a partir de espécimes selvagens e os provenientes dos sistemas de cultivo de São Paulo e da Bahia.

## 4. Discussão

### 4.1. Variabilidade dos estoques naturais e de sistemas de cultivo

As análises genéticas são de notável relevância para o conhecimento da dinâmica e da estrutura populacional em sistemas de cultivo. Informações genéticas podem ser traduzidas em ganhos expressivos na produção e na conservação de peixes (Povh et al., 2008), dado que a perda da variabilidade genética, comuns em diversos sistemas de cultivo (Yokota et al., 2003; Sekino et al., 2004), podem acarretar o desenvolvimento de problema, tais como: a diminuição da adaptabilidade e da sobrevivência de progênies (Povh, 2007). O conhecimento da diversidade genética entre estoques naturais e/ou entre os diversos sistemas de cultivos de peixes é fundamental para o manejo correto das espécies (Gomes, 2007).

Não são raros os estudos que tem demonstrado que as diversas espécies de peixes provenientes de sistemas de cultivo apresentam variabilidade genética inferior aos encontrados nas populações de vida livre. Exemplo disso tem sido relatado no estudo do Panarari (2006), o qual demonstrou que espécies de *Brycon orbignyianus* de vida livre, coletadas no rio Paraná, possuem maior polimorfismo genético em relação às populações coletados na estação de piscicultura de Piracema em Maringá/PR, evidenciando a existência de variabilidade genética nesta espécie.

Por outro lado, a utilização consciente de um plantel de reprodutores e o manejo adequado entre os diferentes sistemas de cultivo pode fornecer contribuição para redução de perda variabilidade genética. Exemplo disso tem sido demonstrado nos programas de repovoamento de espécies aquáticas. Lopera Barrero *et al* (2008) demonstrou que alevinos de *Prochilodus lineatus*, provenientes de dois sistemas de cultivo distintos, não apresentaram uma alta diferenciação genética, possivelmente devido ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo instituído nos programas de repovoamento.

Por sua vez, os resultados obtidos no presente estudo têm apontado para uma maior similaridade genética entre os espécimes selvagens do cobia amostrados na região litorânea do nordeste brasileiro ( $F_{ST} = 0,02556$ ;  $p = 0,32432+0,0433$ ). As análises com os marcadores de microssatélites corroboram com a baixa diversidade genética evidenciada neste grupo ( $\phi_{st} = -0,05278$ ;  $p = 0,000$ ). Estes dados são compatíveis com os realizados por Gold *et al* (2013) com o cobia selvagem da costa

oeste do EUA, e de certa forma esperados, dado a proximidade das regiões de coleta e, principalmente, por se trata de uma espécie com estilo de vida pelágica e amplamente distribuído ao longo do litoral brasileiro. Contudo, aspectos relativos ao espaço amostral das populações selvagens devem ser considerados, dado o número reduzido de espécimes amostrados no estado do Ceará (N = 6 espécimes), o que não possibilita reduzir erros de estimativas de frequência haplotípica na região litorânea desse estado.

Por outro lado, os estoques dos sistemas de cultivo se mostraram distintos dos estoques naturais, como demonstrado pelos genes mitocondriais ( $F_{ST} = 0,2304$ ;  $p = 0,00$ ). Não obstante, os sistemas de cultivo se apresentaram diversos também si, apresentando valores significativos de divergência gênica. Dentre os sistemas de cultivo, a população de Pernambuco se mostrou como a mais diferenciada, formando haplótipos observados apenas nesta população (H\_5 e H\_6). Os dados dos marcadores de microssatélites evidenciaram a divergência gênica entre os sistemas de cultivo de Pernambuco com os estabelecidos em São Paulo e na Bahia ( $\phi_{st} = 0,10878$ ;  $p = 0,00$  e  $\phi_{st} = 0,06395$ ;  $p = 0,00$  respectivamente). Uma das possíveis explicações para este maior distanciamento genético observado na população de Pernambuco está na falta de manejo e de confiabilidade no que diz respeito à origem dos reprodutores juvenis utilizados neste sistema de cultivo.

Fato interessante às análises de proximidade genética, entre espécies de vida livre e os provenientes dos sistemas de cultivos, é observado entre as populações do Ceará e da Bahia. As análises do *mtDNA* evidenciaram uma proximidade gênica entre estas populações ( $F_{ST} = 0,31850$ ;  $p = 0,01802+-0,0121$ ). Esta proximidade genética pode ter explicação na formação do plantel de reprodutores do sistema de cultivo da Bahia, o qual foi formado a partir de espécimes selvagens coletadas na região litorânea da Baía de Todos os Santos. Contudo, deve ser observado que na herança materna, que caracteriza os marcadores mitocondriais, a perda de informações genética por deriva é menor que a encontrada em marcadores de microssatélites. Este fato pode ser utilizado também para justificar a maior similaridade gênica entre os sistemas de cultivo de São Paulo e da Bahia observada através dos dados mitocondriais ( $F_{ST} = 0,17437$ ;  $p = 0,00901+-0,0091$ ), porém com uma moderada diferenciação genética pronunciada através dos marcadores de microssatélites ( $\phi_{st} = 0,04879$ ;  $p = 0,00$ ).

#### 4.2. *Endogamia nos estoques*

As populações selvagens do cobia se mostraram divergentes quanto aos aspectos de endogamia nos grupos analisados. Contudo, o baixo espaço amostral do grupo do Ceará impossibilita a inferência mais precisa sobre a dinâmica neste grupo. Por outro lado, os espécimes amostrados no litoral do estado do Piauí mostraram coeficiente de endogamia baixo ( $F_{IS} = 0,085$ ;  $p = 0,00$ ), indicando que cruzamento entre os espécimes de vida livre tem ocorrido entre indivíduos aparentados. Este dado associado à baixa diversidade genética observado nesta espécie pode ser um indicativo que a fecundação dos óvulos liberados pelas fêmeas de vida livre no ambiente aquático possa ocorrer por um pequeno número de reprodutores.

Por outro lado, valores expressivos de endogamia em sistema de cultivo são esperados devidos, principalmente, aos acasalamentos não aleatórios. De fato, isso tem sido observado nos espécimes do sistema de cultivo da Bahia, que apresentaram valores significativos de coeficiente de endogamia ( $F_{IS} = 0,081$ ;  $p = 0,00$ ), próximo ao encontrado nos espécimes de vida livre do Piauí. Contudo, a taxa de endogamia encontrada nos sistema de cultivo de São Paulo e de Pernambuco ( $F_{IS} = 0,014$  e  $F_{IS} = 0,012$ , respectivamente) tem se mostrado menor.

#### 4.3. *Potencial de exploração da variabilidade genética em termos comercial*

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram através dos marcadores moleculares a existência de baixa variabilidade genética entre os espécimes de estoques naturais e os provenientes de sistema de cultivo. As análises genéticas entre os diferentes sistemas de cultivos apresentaram informações de grande importância, os quais podem ser utilizados para conseguir ganhos expressivos na produção, conservação e manutenção de bancos de germoplasma. Neste sentido, a variabilidade genética encontrada no sistema de cultivo da Bahia é compatível ao encontrado em espécimes de vida livre. Por outro lado, os resultados encontrados neste estudo têm demonstrado que o sistema de cultivo de Pernambuco requer um manejo adequado do plantel de reprodutores.

## 5. Conclusão

De modo geral, a associação dos resultados obtidos como as análises do *mtDNA* e com os marcadores microssatélites demonstraram que apesar da baixa diversidade genética observada entre os espécimes selvagens e os do sistema de cultivo, uma estruturação genética tem sido observada. Este fato torna-se importante quando observamos que a atividade de cultivo do cobia (*Rachycentron canadum*) é recente no Brasil, e que políticas voltadas para conservação dos estoques naturais devem ser realizadas.

## 6. Referências

- ALMEIDA, F.S., SODRE, L.M.K., CONTEL, E.P.B., 2003. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genet. Mol. Biol.* 26, 301-305.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- BENETTI, D.; ORHUN, M.; ZINK, I. Aquaculture of Cobia (*Rachycentron canadum*) in the Americas and the Caribbean. **Cobia aquaculture: ...**, p. 1–21, 2007.
- BOROWSKY, R.L., 2001. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 143-148.
- CHATTERJI, S.; PACHTER, L. Reference based annotation with GeneMapper. **Genome biology**, v. 7, n. 4, p. R29, 2006.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.
- FALCONER, D.S. Introdução a genética quantitativa. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.
- GOMES, P. C. Diversidade genética de três estoques de Piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá/PR. 2007.
- GOUDET, J. FSTAT: a computer program to calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 104, p. 586–590, 2013.
- LABATE, J. A. Software for Population Genetic Analyses of Molecular Marker Data. **Crop Science**, v. 40, n. 6, p. 1521, 2000.
- LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; BOSO, K. M. O. e 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. *Biosci. J., Uberlândia*. 24 (4): 86-93. 2008.
- PANARARI, R. de S. Variabilidade genética, evidenciada por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial, de espécies do gênero *Brycon* (Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR. 2006.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 19, p. 2537–9, 2012.

- PINEDA-SANTIS, H.R., 2004. Estudio genético de las cachamas (subfamilia *Serrasalminae*) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17, 62-63.
- POVH, J.A., 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 75p.
- RAMOS, J. V. B. Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2007.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103–106, 2008.
- SAURA, M., CABALLERO, P., CABALLERO, A., MORÁN, P., 2006. Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 1290-1296.
- SEKINO, M., SUGAYA, T., HARA, M., TANIGUCHI, N., 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233, 163-172.
- SONSTEBO, J.H., BORGSTROM, R., HEUN, M., 2007. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv. Genet.* 8, 33-44.
- SOUZA, M. E. de. Caracterização Genética de reprodutores de tilápia: estratégias para a manutenção da variabilidade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE. 2007.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- WINNENPENNINCKX, B. DNA Extraction - CTAB Method. **Cell Harvesting**, n. March, p. 14–15, 2009.
- YEH, S.-P. Cobia Culture in Taiwan. **Science And Technology**, n. April, p. 2000–2000, 2000.
- YOKOTA, M., HARADA, Y., IIZUKA, M., 2003. Genetic drift in hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fish. Sci.* 69, 101-109.

## 7. Anexos

### ANEXO 1. Loci de microssatélites utilizados para a caracterização genética das populações de cobia.

	Primer	Fluorescente 5'	Tamanho		Sequence	
<b>BM1</b>	Rca1-H10_F	6'FAM	119-139	5'	GCACCGCACTGCACAACAC	3'
	Rca1-H10_R			5'	GCTGTGCATACTCACACTGCT	3'
	Rca1B-A10_F	VIC	174-186	5'	GCAGCCCAATGCTAACAAGCC	3'
	Rca1B-A10_R			5'	CATGTAGTCAAGCGAGCCACG	3'
	Rca1B-E08A_F	6'FAM	181-225	5'	CATATCAAGTCAATATCACAGACC	3'
	Rca1B-E08A_R			5'	CCACGGAATAGCAGACTTTTCTC	3'
	Rca1-H08_F	NED	273-299	5'	GAGACCTACATGGCAGAAGGT	3'
	Rca1-H08_R			5'	GACCACTCCTTTGAGGTCTCT	3'
<b>BM2</b>	Rca1B-C06_F	6'FAM	340-404	5'	CCAGCATATCTCCTCTCAAGAA	3'
	Rca1B-C06_R			5'	GGCTTGAACCTTAACCTACAGTCCT	3'
	Rca1B-H09_F	NED	176-224	5'	CATGTTATTCTCCAACCTCATGG	3'
	Rca1B-H09_R			5'	GTGTATCCGCATACTTTTCAG	3'
	Rca1-A04_F	6'FAM	196-206	5'	CACGCACATGCACTACTTTAACC	3'
	Rca1-A04_R			5'	GCTGTTGATGTGGCGAAGCAAC	3'
	Rca1-E04_F	VIC	216-238	5'	CCAAGAACAGGCGGGCAAC	3'
	Rca1-E04_R			5'	GCCACCATTGTGTGTGGGTGA	3'
<b>BM3</b>	Rca1B-E02_F	VIC	298-314	5'	GTGTTGCAGCCAAATGCTA	3'
	Rca1B-E02_R			5'	CTCCCTAGTGCCACTACAGCTC	3'
	Rca1-A11_F	NED	167-201	5'	CTACAGTGGTGTCCCTGTTAG	3'
	Rca1-A11_R			5'	CAGTACATAGAGAAACAGGAGG	3'
	Rca1-D11_F	6'FAM	204-212	5'	CGTAACACCTTTGGAAGACATC	3'
	Rca1-D11_R			5'	CTCCATTGAGGCTGACTAGTG	3'
	Rca1-G05_F	VIC	274-282	5'	GGGCTGTCTGCTGGCTGTAA	3'
	Rca1-G05_R			5'	GCATCTGTGCTCCTGGTGAGAGTCCC	3'
<b>BM4</b>	Rca1B-F06_F	6'FAM	260-300	5'	CAAGCAAATGCGTGGCCGA	3'
	Rca1B-F06_R			5'	CGTTAGCAACCACACGAGCTTG	3'
	Rca1-C04_F	NED	223-253	5'	GACATCAAGTGGCACTTTG	3'
	Rca1-C04_R			5'	CACTAAACTGTTCTCCTCTG	3'
	Rca1-E06_F	6'FAM	144-188	5'	GGCACCAATCACTCACTACTG	3'
	Rca1-E06_R			5'	TGTTGAGGTCTATCAGTGCC	3'
	Rca1-E11_F	NED	167-181	5'	GTCCCAGCTCCAGCCCAAAC	3'
	Rca1-E11_R			5'	GACACTGGCTGCGTGAGCA	3'
<b>BM4</b>	Rca1-F10_F	VIC	287-297	5'	CCGTTCTGTACAGACGTGAAC	3'
	Rca1-F10_R			5'	GCCTGTTGCTGTTTCTGTCA	3'
	Rca1-H01_F	6'FAM	275-311	5'	GTCCCAAGGGAATAGCGAAG	3'
	Rca1-H01_R			5'	CCTCCAGACCAGACAGCAGA	3'
Rca1-B12_F	VIC	177-193	5'	GCTTCAGGCAAGTGAGACC	3'	
Rca1-B12_R			5'	GGGAGGTAATTATGCCTGT	3'	

**ANEXO 2.** Desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos do cobia. ( $\chi^2$  : Valores de qui-quadrado; Df: graus de liberdade).

Pop	SELVAGEM								CULTIVO											
	CE <i>n</i> = 6				PI <i>n</i> = 24				PE <i>n</i> = 9				SP <i>n</i> = 20				BA <i>n</i> = 28			
LOCI	DF	$\chi^2$	Prob	Signif	DF	$\chi^2$	Prob	Signif	DF	$\chi^2$	Prob	Signif	DF	$\chi^2$	Prob	Signif	DF	$\chi^2$	Prob	Signif
H10	10	3,061	0,98	ns	21	38,642	0,011	.	6	3,322	0,767	ns	6	15,909	0,014	.	10	3,003	0,981	ns
A10	3	6	0,112	ns	3	1,078	0,782	ns	3	0,678	0,878	ns	3	3,306	0,347	ns	15	40,679	0	...
E08	6	4,5	0,609	ns	21	22,75	0,357	ns	10	8,3	0,6	ns	21	34	0,036	.	36	39,259	0,326	ns
C06	21	20	0,521	ns	28	41,025	0,053	ns	21	15,75	0,784	ns	45	69,964	0,01	..	55	73,266	0,05	ns
H08	21	22,5	0,371	ns	66	72,538	0,271	ns	6	14,246	0,027	.	66	86,738	0,044	.	21	34,43	0,033	.
H09	3	10	0,019	.	10	16,501	0,086	ns	6	10,009	0,124	ns	6	22,385	0,001	..	10	48,142	0	...
E02	1	0,12	0,729	ns	MM				MM				1	0,016	0,901	ns	1	0,053	0,819	ns
E04	3	1,444	0,695	ns	6	2,468	0,872	ns	1	0,163	0,686	ns	3	0,489	0,921	ns	3	8,219	0,042	.
A04	3	2,333	0,506	ns	21	56,484	0	...	6	4,84	0,565	ns	10	5,058	0,887	ns	15	9,973	0,821	ns
D11	MM				3	31,939	0	...	1	0,141	0,708	ns	1	0,062	0,803	ns	1	2,559	0,11	ns
A11	6	2,778	0,836	ns	10	10,082	0,433	ns	1	9	0,003	..	10	14,76	0,141	ns	6	15,773	0,015	.
C04	MM				1	3,42	0,064	ns	1	0,031	0,86	ns	1	2,203	0,138	ns	6	4,521	0,607	ns
G05	6	10,2	0,116	ns	28	124,493	0	...	3	8,921	0,03	.	6	34,116	0	...	21	76,181	0	...
F06	21	18,333	0,628	ns	55	114,689	0	...	6	2,772	0,837	ns	36	70,2	0,001	...	55	165,963	0	...
D10	55	54	0,513	ns	120	187,926	0	...	28	23,333	0,716	ns	66	82,242	0,086	ns	45	47,295	0,379	ns
F10	MM				3	29,05	0	...	MM				MM				1	22	0	...
E06	3	0,75	0,861	ns	28	67,054	0	...	6	9,064	0,17	ns	36	75,893	0	...	28	18,636	0,909	ns
B12	MM				6	0,546	0,997	ns	3	1,293	0,731	ns	15	21,689	0,116	ns	3	3,595	0,309	ns
H01	10	9	0,532	ns	45	96,41	0	...	10	8,889	0,543	ns	15	17,903	0,268	ns	45	53,202	0,188	ns
E11	1	0,75	0,386	ns	6	11,166	0,083	ns	1	1,331	0,249	ns	15	20,698	0,147	ns	6	7,826	0,251	ns

(.) P<0.05, 5% Valores significativos; (..) P<0.01, 1% Valores significativos; (...) P<0.001, 0.1% Valores significativos; (ns)P>0.05, 5% Valores significativos.

MM=Monomórfico.

**ANEXO 3.** Variação alélica em cada locos em análise no cobia (*Rachycentron canadum*). Número de alelos encontrados (N), número de alelos diferentes (Na), número de alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e índice fixação (F).

Pop		H10	A10	E08	C06	H08	H09	E02	E04	A04	D11	A11	C04	G05	F06	D10	F10	E06	B12	H01	E11		
SELVAGEM	CE n = 6	N	6	6	6	6	5	3	4	4	5	5	5	5	5	6	3	3	3	3	3	3	
		Na	5	3	4	7	7	3	2	3	3	1	4	1	4	7	11	1	3	1	5	2	
		Ne	2,6	2,3	3,1	6	5,1	2,3	1,4	2,5	2,5	1	3,8	1	2,9	5,6	10,3	1	2	1	4,5	1,8	
		Ho	0,8	1	1	1	0,8	0,4	0,3	0,5	0,8	0	1	0	0,2	1	1	0	0,7	0	1	0,7	
		He	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,6	0,3	0,6	0,6	0	0,7	0	0,7	0,8	0,9	0	0,5	0	0,8	0,4	
		F	-0,4	-0,8	-0,5	-0,2	0	0,3	-0,2	0,2	-0,3	0	-0,4	0	0,7	-0,2	-0,1	0	-0,3	0	-0,3	-0,5	
	PI n = 24	N	26	26	26	10	28	23	24	24	24	29	29	29	27	29	27	29	29	29	28	29	
		Na	7	3	7	8	12	5	1	4	7	3	5	2	8	11	16	3	8	4	10	4	
		Ne	4,9	1,9	3,6	4,1	8	1,4	1	2,3	2,9	2,2	2,9	1,2	5,2	6,8	11,5	1,4	2,7	1,3	7,5	2,6	
		Ho	1	0,5	1	0,4	0,8	0,2	0	0,5	0,8	0,3	0,9	0,1	0,2	0,8	0,9	0,1	0,7	0,2	0,8	0,9	
		He	0,8	0,5	0,7	0,8	0,9	0,3	0	0,6	0,7	0,6	0,7	0,2	0,8	0,9	0,9	0,3	0,6	0,2	0,9	0,6	
		F	-0,2	-0,1	-0,4	0,5	0,1	0,4	0	0,1	-0,2	0,4	-0,3	0,3	0,7	0,1	0	0,8	-0,1	-0,1	0,1	-0,4	
	CULTIVO	PE n = 9	N	9	9	9	7	9	8	8	8	8	9	9	9	7	9	8	8	9	9	8	9
			Na	4	3	5	7	4	4	1	2	4	2	2	2	3	4	8	1	4	3	5	2
			Ne	2,5	2,1	4,2	4,9	2,7	2,2	1	1,3	2,5	1,2	2	1,1	2,6	3,4	6,1	1	3,4	2,2	3,9	1,7
Ho			0,8	0,6	0,9	0,7	0,2	0,4	0	0,3	0,9	0,2	1	0,1	0,1	0,6	0,9	0	1	0,4	1	0,6	
He			0,6	0,5	0,8	0,8	0,6	0,6	0	0,2	0,6	0,2	0,5	0,1	0,6	0,7	0,8	0	0,7	0,5	0,7	0,4	
F			-0,3	-0,1	-0,2	0,1	0,7	0,3	0	-0,1	-0,5	-0,1	-1	-0,1	0,8	0,2	0	0	-0,4	0,2	-0,3	-0,4	
SP n = 20		N	18	18	18	17	18	16	17	17	17	18	18	17	15	18	20	16	16	16	16	16	
		Na	4	3	7	10	12	4	2	3	5	2	5	2	4	9	12	1	9	6	6	6	
		Ne	3,5	2,3	3,7	8,1	4,9	1,5	1,1	2,3	2,2	1,1	3,4	1,6	2,3	5,7	6,8	1	3,9	2,7	4,1	3,2	
		Ho	0,9	0,7	0,9	0,6	0,7	0,1	0,1	0,5	0,7	0,1	1	0,5	0,1	1	1	0	0,6	0,4	0,9	0,8	
		He	0,7	0,6	0,7	0,9	0,8	0,3	0,1	0,6	0,5	0,1	0,7	0,4	0,6	0,8	0,9	0	0,7	0,6	0,8	0,7	
		F	-0,3	-0,2	-0,3	0,3	0,2	0,6	0	0,1	-0,3	-0,1	-0,4	-0,4	0,9	-0,2	-0,1	0	0,2	0,3	-0,2	-0,1	
BA n = 28		N	24	24	24	23	27	24	21	27	25	28	28	28	25	28	27	22	22	23	23	23	
		Na	5	6	9	11	7	5	2	3	6	2	4	4	7	11	10	2	8	3	10	4	
		Ne	2,8	2,6	4,8	7,3	5,3	1,5	1,1	1,7	2,6	1,6	2,4	1,3	4,1	5,4	6,2	1,1	3,6	1,8	5,8	3	
	Ho	0,7	0,4	1	0,7	0,7	0,1	0,1	0,2	0,8	0,5	0,9	0,3	0,2	0,6	0,9	0	0,8	0,3	0,9	0,8		
	He	0,6	0,6	0,8	0,9	0,8	0,3	0,1	0,4	0,6	0,4	0,6	0,3	0,8	0,8	0,8	0,1	0,7	0,5	0,8	0,7		
	F	0	0,3	-0,2	0,2	0,1	0,6	0	0,5	-0,3	-0,3	-0,5	0	0,7	0,3	-0,1	1	-0,1	0,3	-0,1	-0,2		