UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
LETÍCIA RAFAELA DE MORAIS

CONECTIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus*) EM ESTUÁRIOS DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL: UMA ABORDAGEM PARA SUBSIDIAR A AVALIAÇÃO DE IMPACTOS SOBRE UM RECURSO-ALVO DE PESCARIAS COMERCIAIS E AMADORAS

Mogi das Cruzes, SP
2022

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LETÍCIA RAFAELA DE MORAIS

CONECTIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus*) EM ESTUÁRIOS DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL: UMA ABORDAGEM PARA SUBSIDIAR A AVALIAÇÃO DE IMPACTOS SOBRE UM RECURSO- ALVO DE PESCARIAS COMERCIAIS E AMADORAS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios.

Orientador: Profº Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Coorientador: Profº Dr. Domingos Garrone Neto

Mogi das Cruzes, SP

2022

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Morais, Letícia Rafaela de
M828c Conectividade e caracterização genética do robalo-peva (*centropomus parallelus*) em estuários das regiões Sul e Sudeste do Brasil: uma abordagem para subsidiar a avaliação de impactos sobre um recurso-alvo de pescarias comerciais e amadoras / Letícia Rafaela de Morais. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
103 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

1.Pesqueiros 2. Variação genética 3. Perciformes/genética I. Hilsdorf, Alexandre Wagner Silva II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 576.58

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES.

Às treze horas do dia vinte e cinco de novembro de dois mil e vinte e dois, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada **"**CONECTIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO ROBALO-PEVA (Centropomus parallelus) EM ESTUÁRIOS DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL: UMA ABORDAGEM PARA SUBSIDIAR A AVALIAÇÃO DE IMPACTOS SOBRE UM RECURSO-ALVO DE PESCARIAS COMERCIAIS E AMADORAS**"** para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Letícia Rafaela de Morais**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 74 (setenta e quatro), a saber: 38 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, e Marília Cristina Duarte, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, e Maria Raquel Moura Coimbra, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e Bruno Lopes da Silva Ferrette, do Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pelo o senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada (aprovado(a) /reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria).

Mogi das Cruzes, 25 de novembro de 2022.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Maria Raquel Moura Coimbra	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva Ferrette	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Marília Cristina Duarte	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))

Digitally signed by Marilia
DN: cn=Marilia, o, ou, email=mariliacd@umc.br, c=BR
Date: 2022.12.13 15:42:58 -02'00'

DEDICATÓRIA

Com todo meu carinho e amor dedico essa tese ao meu filho Enzo e ao meu avô Loraydan (*in memorian*) que sempre foi minha maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, não só por ter aceitado me orientar e confiado este projeto a mim, mas por toda a inspiração e abertura para me atender desde a iniciação científica, por toda confiança e apoio durante todos esses anos;

Ao meu coorientador Domingos Garrone Neto, que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho e que sempre esteve disponível para me ajudar durante a realização do projeto;

Ao professor, pesquisador e colaborador do projeto Acácio Ribeiro Gomes Tomás, que nos ajudou com coletas, ideias e discussões sobre os resultados e com quem aprendi e admiro muito;

À Universidade de Mogi das Cruzes – UMC por ceder estrutura necessária para realização dos experimentos e ajuda no financiamento para a participação em congressos; aos colegas e professores do Núcleo Integrado de Biotecnologia;

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP pelo financiamento do projeto, processo: 2019/07.023-2;

Ao Danilo Vitoriano que pude coorientar durante suas duas iniciações científicas e que me ajudou durante alguns experimentos desse trabalho, obrigada pelo companheirismo e amizade;

Ao Caio Perazza por todo apoio desde o início desse projeto e principalmente por toda ajuda com estatística dos resultados;

Aos integrantes do LAGOAA, Danilo Vitoriano, Danilo Caneppele, Caio, Máira, Jackson, Sabrina, Gabriela, Pâmela, Micheli, Claudiane, Ayana, Raquel e Nane pelo companheirismo;

A todos os pescadores e pesquisadores que ajudaram nas coletas e fazem parte do Projeto Robalo;

Ao pesquisador e colaborador Rodrigo Rodrigues Domingues por toda contribuição na escrita e posteriormente auxiliar nas análises do projeto, por todo ensinamento e inspiração desde a iniciação científica;

À minha família, em especial meus pais Cecília e Alexandre, que me ajudou indiretamente durante a realização dessa etapa que sempre foi um sonho para mim;

Ao meu companheiro João Victor que me apoiou durante todo o processo, inclusive em coletas e formatações do trabalho e até mesmo no apoio financeiro.

(...) Quem é de verdade sabe quem é de mentira
Não menospreze o dever que a consciência te impõe
Não deixe para depois, valorize a vida
Resgate suas forças e se sinta bem
Rompendo a sombra da própria loucura
Cuide de quem corre do seu lado e quem te quer bem
Essa é a coisa mais pura (...)”

Charlie Brown Jr.

RESUMO

O uso dos recursos biológicos marinhos tem sido ao longo dos tempos uma fonte de alimentos e de geração de riqueza para diferentes países ao redor do mundo. Dentre os diversos táxons que habitam os oceanos, os peixes têm sido o alvo principal da pesca artesanal, esportiva e industrial. Na família Centropomidae (ordem Perciformes) encontra-se o gênero *Centropomus* Lacépède (1802), com 12 espécies consideradas taxonomicamente válidas. A espécie *Centropomus parallelus* – robalo-peva – é uma espécie cuja ocorrência está associada a baias e regiões de estuários. Dados publicados sobre o ciclo reprodutivo e estrutura genética populacional de *C. parallelus* nas suas regiões de ocorrência são escassos. Contudo, sua importância para pesca artesanal e esportiva é cada vez mais crescente devido a sua esportividade quando fisgado e à qualidade da sua carne. Face ao exposto, o presente estudo objetivou desenvolver e utilizar marcadores moleculares para avaliação genética de populações do robalo-peva, *C. parallelus*, amostradas ao longo de um gradiente latitudinal de estuários localizados nas regiões Sudeste e Sul do litoral brasileiro para testar a hipótese de estruturação das populações residentes nos estuários. Para isso foi utilizado marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie em questão e posteriormente foi analisada a variabilidade genética contemporâneas das populações de robalo peva ao longo da costa sul e sudeste do Brasil. Os microssatélites foram desenvolvidos para espécie por Sequenciamento de Próxima Geração e avaliados por genotipagem semiautomática. De acordo com os resultados obtido observamos indicativos de estruturação genética entre as localidades amostradas e observamos como a formação geológica dessas regiões estuarinas podem ter influenciado no fluxo gênico entre essas populações, além disso, Florianópolis e Torres foram as únicas localidades que demonstrou índice de diferenciação genética de 0,01 indicando alto fluxo gênico entre essas regiões. O uso dos marcadores microssatélites sugerindo diferenciação populacional entre estuários abre novos campos de estudos no sentido de se entender processos de adaptação local. O presente trabalho gerou informações de base científica que contribuem para um melhor conhecimento genético do robalo-peva de maneira a conservar suas populações, garantindo sua sustentabilidade e existência para as futuras gerações.

Palavras-chave: Recursos pesqueiros; Diversidade genética; Conservação; Centropomidae.

ABSTRACT

The use of marine biological resources has been, throughout the ages, a source of food and wealth generation for different countries around the world. Among the various taxa that inhabit the oceans, fish have been the main target of artisanal, sport and industrial fishing. In the Centropomidae family (order Perciformes) is the genus Centropomus Lacépède (1802), with 12 species considered taxonomically valid. The species Centropomus parallelus - sea bass - is a species whose occurrence is associated with bays and estuarine regions. Published data on the reproductive cycle and genetic population structure of C. parallelus in its regions of occurrence are scarce. However, its importance for artisanal and sport fishing is increasing due to its sportiness when hooked and the quality of its meat. In view of the above, the present study aimed to develop and use molecular markers for genetic evaluation of populations of the European sea bass, C. parallelus, sampled along a latitudinal gradient of estuaries located in the Southeast and South regions of the Brazilian coast to test the hypothesis of population structure residing in estuaries. To this end, microsatellite markers developed for the species were used and subsequently the contemporary genetic variability of the sea bass populations along the south and southeast coast of Brazil was analyzed. The microsatellites were developed for the species by Next Generation Sequencing and evaluated by semi-automatic genotyping. According to the results obtained we observed indications of genetic structure among the sampled localities and observed how the geological formation of these estuarine regions may have influenced the gene flow between these populations. Moreover, Florianópolis and Torres were the only localities that showed a genetic differentiation index of 0.01 indicating high gene flow between these regions. The use of microsatellite markers suggesting population differentiation between estuaries opens new fields of study in order to understand local adaptation processes. The present work generated scientifically based information that contributes to a better genetic knowledge of the sea bass in order to conserve its populations, ensuring its sustainability and existence for future generations.

Keywords: Fishery resources; Genetic diversity; Conservation; Centropomidae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Robalo-peva, *Centropomus parallelus* Poey, 1860. 22
Figura 2- Distribuição da espécie *Centropomus parallelus* 23
Figura 3 - Estrutura esquemática do trabalho desenvolvido com *Centropomus parallelus*, em regiões de estuários no Sudeste e Sul do litoral brasileiro e referências aos respectivos capítulos da tese. 26
Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6,5%, com amostras de DNA avaliadas no aparelho DNA Analyzer 4300 e programa SAGA demonstrando a genotipagem das amostras e seus respectivos alelos. 42
Figura 5 - Confirmação dos picos com a média geral do locus (vermelho), média da amostra (branco) entre o analisado pelo aparelho (azul) e observador (azul e vermelho). A: pico representando indivíduos heterozigotos. B: picos representando indivíduos homozigotos 42
Figura 6 - Área de estudo, com a indicação dos oito pontos de coleta de amostras, sendo A: Tramandaí- RS; B: Torres- RS; C- Florianópolis- SC; D: Guaratuba- PR; E: Cananéia- SP; F: Guaraú- SP; G: Registro- SP; H: Cubatão- SP; I: Bertioga- SP, J: Paraty- RJ. 60
Figura 7 - Gráfico de calor gerado pelo pacote popopr com o percentual de dados perdidos 63
Figura 8 - Gráfico boxplot de endogamia das populações observadas 72
Figura 9 - Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) para investigar a estrutura genética da população de Centropomus parallelus. (A) cada barra vertical representa um indivíduo no diagrama DAPC e cada cor representa a probabilidade de pertencer a um dos grupos genéticos; (B) representação da DAPC num gráfico em ScatterPlot para agrupamento das populações amostradas e (C) número de componentes principais 73
Figura 10 - Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) do Complexo estuarino Cananéia-Iguape. (A) cada barra vertical representa um indivíduo no diagrama DAPC e cada cor representa a probabilidade de pertencer a um dos grupos genéticos; (B) representação da DAPC num gráfico em ScatterPlot para agrupamento das populações amostradas e (C) número de componentes principais 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - 15 *locus* polimórficos específicos para espécie *Centropomus parallelus*. 43
Tabela 2 - Análise par a par realizada no programa GENEPOP para verificação dos *loci* que se encontram em desequilíbrio de ligação. 44
Tabela 3 - Amostragens realizadas durante o primeiro ano do projeto. 59
Tabela 4 - Condições de amplificação utilizadas no termociclador. 61
Tabela 5 - Média e variância dos estimadores pontuais de parentesco. 63
Tabela 6 - Correlação entre os Estimadores Pontuais de Parentesco (EPP). 64
Tabela 7 - Estatística descritiva (N – número de indivíduos; A – número de alelos; Ar – riqueza alélica; Ho – heterozigosidade observada; He - heterozigosidade esperada e Fis.). 65
Tabela 8 - Identificação do *locus* seguido do alelo privativo separados por população e entre parênteses o número de repetições em que apareceram 68
Tabela 9 - Análise par a par de parentesco entre as populações amostradas 69
Tabela 10 - Número efetivo populacional (Ne) por localidade 70
Tabela 11- Abaixo da diagonal principal representando o índice Dest para diferenciação populacional de animais da espécie C. paralellus amostrados em nove sete localidades (Guaratuba- PR (GUA); Cubatão- SP (CUB); Bertioga-SP (BER); Paraty- RJ (PTY); Cananéia-SP 75
Tabela 12 - Abaixo da diagonal principal representando o índice Dest para diferenciação populacional de animais da espécie C. paralellus amostrados em três localidades (Guaraú, Registro e Cananéia) e intervalo de confiança representados acima da diagonal principa 76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

bP	pb Pares de base
DAPC	*Discriminant analysis of principal components*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EPP	Estimadores Pontuais de Parentesco
ESU	*Evolutionary Unit Significant*, Unidade Evolutivamente Significativa
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GBS	Genotyping by sequence
Ho	Heterozigosidade observada
He	Heterozigosidade esperada
IUCN	International Union for Conservation of Nature
KCl	Cloreto de potássio
LAGOAA	Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura
mM	Milimolar
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
*N*e	Número efetivo de alelos
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
SP	São Paulo
SSR	*Simple Sequence Repeats* ou microssatélites
STR	*Short Tandem Repeats* ou microssatélites
UMC	Universidade de Mogi das Cruzes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
1.1 PEIXES SOBRE PERIGO: AS AMEAÇAS À SUSTENTABILIDADE DA PESCA MARINHA 15
1.1.1 Marcadores genéticos aplicados aos recursos pesqueiros 18
1.2 O GÊNERO *Centropomus* 20
1.2.1 *Centropomus parallelus* 22
1.3 JUSTIFICATIVA 25
1.4 OBJETIVOS 25
1.5 APRESENTAÇÃO DA TESE 26
REFERÊNCIAS 27
CAPÍTULO I 35
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LÓCUS MICROSSATÉLITES E SNPS DA ESPÉCIE *Centropomus parallelus* POR SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO 35
RESUMO 36
ABSTRACT 37
2. INTRODUÇÃO 38
2.1 MATERIAL E MÉTODO 39
2.1.1 Sequenciamento, desenvolvimento e seleção de marcadores microssatélites 39
2.1.2 Caracterização dos *loci* microssatélites 40
2.1.3 Análises estatísticas 40
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
2.4 CONCLUSÃO 48
REFERÊNCIAS 49
CAPÍTULO II 52
DIVERSIDADE GENÉTICA INTER E INTRAPOPULACIONAL DA ESPÉCIE *Centropomus parallelus* AO LONGO DE ESTUÁRIOS DAS REGIÃO SUL E SUDESTE DO BRASIL: DA BANCADA AO MANEJO SUSTENTADO. 52

RESUMO **53**
ABSTRACT **54**
3. INTRODUÇÃO **55**
3.2 MATERIAL E MÉTODOS **58**
3.2.1 Locais de coleta **58**
3.2.2 Extração de DNA e purificação **60**
3.2.3 Amplificação por PCR **60**
3.2.4 Genotipagem **61**
3.2.5 Análises estatísticas **62**
3.3 RESULTADOS **62**
3.3.1 Análise e filtragem do banco de dados **62**
3.3.2 Diversidade genética intrapopulacional **64**
3.3.3 Avaliação da diversidade genética interpopulacional na região Sul e Sudeste da costa do Brasil **71**
3.3.4 Complexo Estuarino Cananéia-Iguape **75**
3.4 DISCUSSÃO **78**
3.4.1 Diversidade genética intrapopulacional **78**
3.4.2 Avaliação da diversidade genética interpopulacional na região Sul e Sudeste da costa do Brasil **81**
3.4.3 Complexo Estuarino Cananéia-Iguape **87**
3.5 MANEJO REPRODUTIVO E CONSERVAÇÃO DO RECURSO GENÉTICO **89**
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **92**
REFERÊNCIAS **93**

1 INTRODUÇÃO

Podemos definir peixe como vertebrado aquático que possui brânquias, membros na forma de nadadeiras e, normalmente, com uma pele contendo escamas de origem dérmica. Contudo o termo “peixe” não é considerado uma unidade taxonômica e não formam um grupo monofilético, isso ocorre devido ao ancestral dos vertebrados terrestres (tetrápodes) incluir um grupo de peixes: os sarcopterígios, portanto, em termos evolutivos os peixes podem ser definidos como todos os vertebrados que não são tetrápodes (HICKMAN *et al*., 2022).

Os peixes surgiram na Era Paleozoica, posteriormente dando origem a dois grupos: Agnatha (peixes sem mandíbula) como por exemplo as lampreias e peixe-bruxa, e posteriormente os Gnathostomata (peixes com mandíbula), essa superclasse atualmente distingue-se, além dos Chondrichthyes (peixes cartilaginosos), em dois grupos distintos que formam os Osteichthyes (peixes ósseos): a classe Sarcopterygii (peixes com nadadeira lobada), incluindo peixes pulmonados e celacantos e Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas) composto por um diverso número de espécie, mais de 27.000 exemplares (HICKMAN *et al*., 2016).

Essa diversidade está relacionada à aquisição de mandíbulas e as adaptações do sistema esquelético, muscular e de flutuação, que consequentemente aumentaram a eficiência locomotora e alimentar, com isso esses animais puderam explorar novos ambientes o que contribuiu para sua ampla diversidade tanto que o período Devoniano ficou conhecido como a “Era dos Peixes” (início há mais ou menos 400 milhões de anos, término 360 milhões de anos atrás) (HICKMAN *et al*., 2016)

Atualmente a classe Actinopterygii é composta três subclasses: Cladistia, Chondrostei e Neopterygii, ocupam um lugar crucial nos ecossistemas marinhos e de água doce além de sua grande importância econômica (CLOUTIER; ARRATIA, 2004; BENEDITO, 2015; NELSON, 2016). A classe Actinopterygii é composta por 54 ordens contabilizando 453 famílias e 4.289 gêneros. Essa diversidade é abrigada principalmente pela região neotropical (composta pelo extremo sul da América do Norte, toda a América Central e do Sul), possuindo uma ictiofauna diversificada surpreendentemente alta, não somente em termos do número de espécies, mas principalmente quando avaliamos em termos comparativos de densidade específica (VARI; MALABARBA, 1998; WILEY; JOHNSON, 2010).

A região Neotropical abriga 4.225 espécies de peixes de água doce, podendo o número superar o dobro desta estimativa (TONELLA *et al.,* 2022). Segundo levantamento feito por

Benedito (2015) é conhecido cerca de 36 ordens pertencentes à Actinopterygii no Brasil, esse alto número é justificado pela área que o país abrange da região, cerca de 50% do território pertence a região Neotropical. O número de espécies para as ordens mais frequentes são: Characiformes (1,289), Siluriformes (1,384), Cichliformes (354), Cyprinodontiformes (245) and Gymnotiformes (135) (TONELLA *et al.*, 2022).

No entanto, a diversidade de espécies tem se tornado cada vez mais ameaçada por ações antrópicas tais como, poluição do ambiente, introdução de espécies exóticas, destruição e modificação de habitats. Esse tipo de interferência resulta não só na perda do habitat, em termos geográficos, como também na redução do número de indivíduos de uma ou mais espécies, contribuindo ao ponto de levá-las a extinção (FRANKHAM, 2003; ASHIKAGA *et al.*, 2015). Em 2017, um estudo sobre o estado de conservação da fauna brasileira feito pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade avaliou 4.494 espécies de peixes (ósseos e cartilaginosos) marinhos e continentais. entre os marinhos, das 1.347 espécies avaliadas, 96 (7,13%) foram listadas em alguma categoria de ameaça no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção; dos 3.147 peixes de água doce avaliados, 312 (9,91%) estão ameaçados de extinção (POLAZ; RIBEIRO, 2017).

Recentemente, a Portaria Nº 148 do Ministério do Meio Ambiente de 7 DE JUNHO DE 2022 anexo 3, atualiza o teor dos anexos I e II da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Em relação aos peixes, um total de 387 espécies estão incluídas na lista, distribuídas em 19 ordens e 13 famílias, nessa lista mais recente foram incluídas mais 40 espécies de peixes que estão categorizadas em algum grau de ameaça (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2022).

Entre espécies de peixes migradores de água doce neotropicais podem ser encontrados diferentes níveis de estruturação genética. Isto levanta importantes implicações para a diversidade genética dessas populações e consequentemente, para a sua utilização sustentável na pesca e na aquicultura, para a conservação e sobrevivência da ictiodiversidade (OLIVEIRA, 2009).

Tendo em vista esse cenário, a Organização das Nações Unidas-ONU criou a agenda 2030, que consiste em um plano global para atingirmos em 2030 um mundo melhor para todos os povos e nações. Em setembro de 2015, foi realizado em Nova York, a Assembleia Geral das Nações Unidas, que contou com a participação de 193 países-membros, estabelecendo 17 objetivos de desenvolvimento sustentáveis (AGENDA 2030, 2022).

Dentro dessas metas temos o objetivo 14, intitulado “vida na água”, que consiste na conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares e dos recursos marinhos para o

desenvolvimento sustentável. Uma das principais metas é que até 2020, devemos efetivamente regular a coleta, e acabar com a sobrepesca, ilegal, não reportada e não regulamentada e as práticas de pesca destrutivas, além de implementar planos de gestão com base científica, para restaurar populações de peixes no menor tempo possível, pelo menos a níveis que possam produzir rendimento máximo sustentável, como determinado por suas características biológicas (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2022)

1.1 PEIXES SOBRE PERIGO: AS AMEAÇAS À SUSTENTABILIDADE DA PESCA MARINHA

Atualmente, os peixes constituem um elemento importante na economia de muitas nações, ao mesmo tempo que dão valor recreativo e psicológico incalculável ao naturalista, entusiasta de esportes e aquarista doméstico, além de seu imenso valor para os seres humanos, têm sido um item básico na dieta de muitos povos.

Infelizmente, em alguns casos, a alta demanda por espécies marinhas para alimentação e outros subprodutos pode acarretar a diminuição de muitos estoques, por exemplo, a espécie *Gadus morhua*, conhecido popularmente como bacalhau do Atlântico, um peixe demersal predador que foi alvo de pesca comercial e recreativa durante décadas (LEAR, 1998).

No Noroeste do Atlântico, o bacalhau tem sido alvo de sobrepesca em toda a sua área de distribuição resultando na diminuição dos estoques em várias unidades populacionais americanas e canadenses durante o início dos anos 90 e atualmente encontra-se como vulnerável na *red list* da *International Union for Conservation of Nature's* (SERCHUK; WIGLEY, 1992; LEAR, 1998; NEUENHOFF *et al.*, 2019; IUCN, 2022).

Também, podemos citar o caso da sardinha, que representa um papel ecologicamente importante na cadeia trófica, sendo consideradas como peixes forrageiros, pois atuam como base alimentar para peixes maiores como tubarões, golfinhos e até mesmo aves marinhas, com isso são elementos chave na sustentação dos ecossistemas (SANTOS *et al*., 2014; PIKITCH *et al*., 2014). A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) é uma espécie de ocorrência costeira e considerada fácil de capturar, pois sua pesca ocorre normalmente entre 30m e 100 m de profundidade. Devido à sobreexplotação da sardinha, houve uma redução em seus estoques sugerindo diferentes hipóteses para a explicação, porém, todas elas tendo a sobrepesca como causa determinante (VASCONCELLOS, 2000; CERGOLE; NETO, 2011).

Devido ao aumento da pesca que contribui para diminuição dos estoques das espécies citadas, alguns acordos internacionais têm sido firmados a fim de remediar esse quadro, por

exemplo, o *Great Lakes Fishery Commission*, uma cooperação transfronteiriça entre os Estados Unidos e o Canadá, cujo um dos principais intuitos é demonstrar que as populações de peixes estão interligadas e que são vulneráveis às mudanças naturais e induzidas pelo homem. Essa comissão recomenda que a restauração de espécies nativas - especialmente peixes predadores – é fundamental para o equilíbrio natural do ecossistema marinho; a introdução de espécies invasivas, a pesca excessiva e a destruição do habitat agem para desestabilizar as comunidades marinhas e com isso a sustentabilidade da pesca (GREAT LAKES FISHERY COMMISSION, 2022). Aliado a essas perturbações ambientais a perda e fragmentação de habitat frequentemente resulta na diminuição e mesmo na extinção de populações geneticamente adaptadas e, com isso, a perda de recursos genéticos importante para a evolução de uma dada espécie (COLEMAN *et al.*, 2018).

Durante um longo período, houve uma tendência em concentrar as pescarias em espécies individuais comercialmente importantes, como o bacalhau, arenque ou sardinha, só nos últimos anos se tornou importante olhar para ecossistemas inteiros e como preservá-los somados a gestão eficaz da pesca. Essa mudança ocorreu devido a numerosos estoques terem sido sobreexplorados em regiões oceânicas no passado resultando em sérias modificações nesses ambientes (SCHRÖDER, 2013). Considerada uma atividade extrativista, a pesca pode ser realizada por vários países, inclusive muitas populações dependem dela em diferentes níveis, seja como fonte de emprego na indústria pesqueira ou mesmo praticando-a como forma de subsistência (HILSDORF *et al.*, 2006).

Mais de 40 milhões de pessoas em todo o mundo dependem da pesca ou da aquicultura para a sua subsistência - esse número mais que triplicou desde 1970. A grande maioria destas pessoas trabalham em países em desenvolvimento, onde a pesca e a aquicultura constituem a espinha dorsal da maioria das áreas costeiras (*National Research Council,* 2009).

Em 2020 a produção total da pesca e da aquicultura foi de 178 milhões de toneladas de animais aquáticos e 36 milhões toneladas de algas, atingindo um recorde de 214 milhões de toneladas, em grande parte devido ao crescimento da aquicultura, principalmente na Ásia. O montante destinado ao consumo humano (excluindo algas) foi de 20,2 kg per capita, mais que o dobro na década de 1960 onde a média era de 9,9 kg per capita (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2022)

Dados de levantamento da produção pesqueira no Brasil são escassos sendo o último publicado em nível nacional pelo antigo Ministério da Pesca, o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (2011). De acordo com o boletim, a produção de pescado nacional para o ano de 2011 foi de 1.431.974,4 t, registrando-se um aumento de aproximadamente 13,2% em relação

a 2010. A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 553.670,0 t (38,7% do total de pescado), seguida pela aquicultura continental (544.490,0 t; 38,0%), pesca extrativa continental (249.600,2 t; 17,4%) e aquicultura marinha (84.214,3 t; ~6%).

No Estado de São Paulo, o governo realiza o acompanhamento das descargas pesqueiras em seus portos desde 1944. Em 1969, essa atribuição passou para o Instituto de Pesca, órgão vinculado à Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Esse levantamento pesqueiro do Estado é publicado em formas de relatórios, o último refere-se ao período de julho a dezembro de 2021, o qual foi registrada a descarga de 6.830,7 t de pescados nos portos paulistas, estimou-se que a captura nesse período gerou uma receita de aproximadamente R$ 64,8 milhões (INSTITUTO DE PESCA, 2022)

O aumento da demanda por essa fonte de alimentação, somada ao expansivo crescimento populacional e a globalização, gerou uma intensa pressão sob os recursos oceânicos, com isso, a pesca em todo o mundo entrou em colapso, as espécies invasoras perturbaram as teias alimentares marinhas, e um número crescente de espécies estão em perigo de extinção como resultado das atividades humanas (*National Research Council*, 2009).

A sobrepesca é vista como a maior ameaça à perda de populações marinhas enquanto mudanças antropogênicas principalmente, a degradação do habitat, ameaça as espécies anádromas, estuarinas e de água doce pois tem o potencial de modificar inteiramente esses ecossistemas (KENCHINGTON, 2003; DAVIES & BAUM, 2012). Os impactos na pesca são devidos a uma variedade de efeitos diretos e indiretos de fatores físicos e químicos os quais incluem a temperatura, ventos, salinidade, oxigénio, pH e outros. Os efeitos diretos atuam sobre a fisiologia, taxas de desenvolvimento, reprodução, comportamento e sobrevivência dos indivíduos, já os efeitos indiretos atuam através de processos do ecossistema e alterações na produção de alimentos ou abundância de concorrentes, predadores e agentes patogênicos (BRANDER, 2010).

De acordo com Pinsky e Palumbi (2014), em seu estudo voltado para peixes sobreexplotados, foi possível observar que a sobrepesca reduziu a diversidade genética em uma ampla gama de peixes marinhos abundantes e que estes os efeitos provavelmente continuarão, a menos as populações tenham a oportunidade de se recuperar. Resultados obtidos por Czorlich (2022), identificou que a aquicultura do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) pode afetar populações selvagens da espécie e enfatizam a importância de identificar alternativas sustentáveis de fontes proteínas para a indústria da aquacultura.

Estimar a abundância de espécies capturadas é um requisito chave para determinar rendimentos sustentáveis ou impactos ambientais, o uso de métricas de diversidade genética podem fornecer indicações sobre a abundância de uma espécie, bem como a sua capacidade de adaptar em resposta à mudança ambiental (OVENDEN *et al.*, 2014). Segundo Melnychuk (2017), não existe uma única estratégia ou tática de gestão desses recursos que produza sucesso em todos os casos, porém é necessário salientar à importância de estabelecer e aplicar limites de captura ou de esforço baseados na ciência para a exploração sustentável das populações marinhas.

Desde então, a preservação dos recursos genéticos tornou-se um elemento importante de conservação, há uma preocupação crescente com as consequências das alterações climáticas para a produção pesqueira e o estado dos ecossistemas marinhos, no contexto da pesca, populações consideradas mais "valiosas" são avaliadas utilizando modelos de dinâmica populacional afim de compreender e avaliar unidades populacionais além de estimar seu fluxo, essas análises genéticas têm muito a oferecer aos gestores de pesca (WARD, 2000; BRANDER, 2010; HILBORN; STOKES, 2010).

1.1.1 Marcadores genéticos aplicados aos recursos pesqueiros

A identificação de um organismo é fundamental para monitoramento, comercialização e estudo de espécies pesqueiras, para isso a utilização do DNA é considerada uma ferramenta viável e amplamente utilizada (VALDEZ-MORENO *et al.*, 2010). Isso ocorre, pois se trata de uma avaliação relativamente rápido, universal e uma ferramenta altamente precisa para identificar espécies, principalmente quando o exemplar não pode ser identificado devido ao seu estágio de desenvolvimento ou em casos de espécies crípticas (FALEIRO, 2007; BALASUNDARAM *et al* ., 2015).

Informações genéticas e genômicas têm sido cada vez mais utilizada para apoiar os esforços de conservação e de gestão que visam populações naturais, tanto que na pesca marinha, as unidades de gestão frequentemente não correspondem às áreas de distribuição das populações biológicas (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006; KERR *et al*., 2017). No entanto, os dados obtidos por meio de metodologias moleculares, associadas a programas estatísticos, têm grande potencial para melhorar a gestão pesqueira, pois a compreensão da estrutura genética de uma população, dentro de uma determinada espécie, pode ser verificada por eventos como mutação, migração e seleção genética (WRIGHT, 1931; HEMMER-HANSEN; 2019).

Os estudos voltados para a genética de populações evoluíram e atualmente contam com três pilares essenciais: técnicas eficientes para acessar segmentos informativos de DNA, estatística para analisar esses dados e a disponibilidade de programas e pacotes de computador específicos para essa função. Os marcadores genéticos respondem às questões biológicas de forma eficiente e contribuem para investigações muito mais amplas da biologia evolutiva, populacional e de conservação (SNNUCKS, 2000). Ao longo dos anos, o avanço das tecnologias associadas ao DNA levou a descoberta de vários marcadores moleculares que detectam o polimorfismo diretamente no DNA e que podem ser aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações e às análises estatísticas que permitem desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e esclarecendo questões de parentesco (MARQUES, 2002; SCHLÖTTERER, 2004; CAMARGO, *et al*., 2016)

Dados genéticos auxiliam pesquisas em relação à investigação e gestão da conservação, facilitando a identificação de populações geneticamente distintas, a detecção da conectividade genética e os possíveis riscos associados às alterações demográficas e acasalamento de indivíduos aparentados (ALLENDORF *et al.*, 2013). Estudos com marcadores microssatélites aplicados a genética da conservação e gestão pesqueira, tem sido bastante utilizado pois são codominantes, altamente polimórfico, facilmente encontrado, de herança mendeliana e se baseiam em sequências de DNA, que consistem na repetição em tandem de nucleotídeos, que se distribuem pelo genoma da maioria das espécies eucarióticas (WARD, 2000; ABDUL-MUNEER, 2014).

Dionne (2008), utilizando 13 *loci* microssatélites, observou que a interação entre o fluxo gênico e a adaptação ao regime térmico explicava a estrutura genética hierárquica observada entre as populações de *Salmo salar*, o salmão do Atlântico. Outros estudos utilizaram microssatélites para avaliar a diversidade genética populacional, por exemplo com a espécie *Pagellus erythrinus*, na região do mar mediterrâneo (ROSSI *et al*, 2019; *Mugil curema* um peixe teleósteo de grande importância econômica no México (PACHECO-ALMANZAR; LOZA-ESTRADA; IBÁÑEZ, 2020); *Chrysophrys auratus* a em águas da Austrália Ocidental (GARDNER *et al.*, 2022); com *Salmo trutta*, em duas populações domesticadas, mostraram que uma forte seleção pode estar atuando sobre os peixes domesticados (HANSEN, 2002) e inúmeros outros trabalhos dessa natureza.

Outra classe de marcadores que tem sido utilizado em estudos genéticos são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* ou Polimorfismo de Sítio Único). Estes marcadores se baseiam em mutações de substituições que estejam presente em pelo menos 1% das populações.

Apresentam uma cobertura ampla no genoma e podem ser usados para avaliar com uma resolução fina diferenças populacionais de grupos isolados, bem como assinatura de adaptação local (SOBRINO *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2012).

Estudos utilizando esses marcadores moleculares aplicados a espécies marinhas vêm se tornando mais usual na literatura científica. No caso dos SNPs, foi possível identificar assinatura genética em indivíduos de *Coryphaena hippurus* em populações mais próxima do estreito de Gibraltar em comparação com outras populações mediterrâneas (MAROSO *et al.,* 2016). Na China avaliando populações de ambiente natural da espécie *Trachidermus fasciatus,* as análises de agrupamento genético revelaram uma estrutura populacional significativa a qual foi justificada à deriva genética e à fragmentação do habitat, provavelmente devido as atividades antrópicas (LI *et al.*, 2019). Em um estuário na Tasmânia, utilizando 4.000 *loci* SNP, foi caracterizado a diversidade genética e a estrutura da população de um dos peixes marinhos mais raros do mundo, *o Brachionichthys hirsutus*, os resultados obtidos indicam que devido à baixa conectividade genética, os grupos populacionais dessas espécies dentro do estuário devem ser considerados como unidades de gestão de conservação separadas (APPLEYARD *et al.,* 2021).

Pouco se conhece sobre como as mudanças geoclimáticas podem influenciar na distribuição da fauna aquática ao longo da costa, especialmente no que se refere à conectividade entre as populações de peixes costeiros-estuarinos. Achados arqueológicos demostraram a presença abundante de otólitos de *C. parallelus* em sambaquis das regiões sul e sudeste do Brasil que datam de 8.720 a 985 mil anos A.C. (GASPAR 1996; LIMA 1999, 2000; WAGNER *et al.,* 2011; MACARIO *et al.,* 2014). Esses dados arqueológicos fazem do robalo-peva um modelo biológico para um estudo fitogeográfico, com abordagens sobre sua demografia histórica, permitindo testar hipóteses relacionadas aos impactos das mudanças ambientais históricas sobre o atual padrão de distribuição da espécie e suas prováveis estratificações populacionais ao longo do tempo.

1.2 O GÊNERO *Centropomus*

A família Centropomidae (ordem Perciformes) foi descrita em 1966 por Greenwood para agrupar os peixes dos gêneros *Hypopterus, Centropomus, Lates* e *Psammoperca*. Atualmente, a família compreende apenas o gênero *Centropomus Lacépède* (1802), com 13 espécies consideradas taxonomicamente válidas, todas de ocorrência nas Américas: na costa Atlântica - *C. ensiferus, C. irae, C. parallelus, C. pectinatus, C. poeyi* e *C. undecimalis* – sendo

que *C. mexicanus* é tratado como um sinonímio de *C. parrallelus*; seis espécies são descritas na costa do pacífico - *C. armatus, C. medius, C. nigrescens, C. robalito, C. unionensis e C. viridis.* Especificamente na costa brasileira, ocorrem pelo cinco espécies do gênero *Centropomus – C. undecimalis, C. parallelus, C. ensiferus e C. pectinatus,* embora existam evidências de um novo táxon na região costeira mais ao norte do Brasil (MENEZES *et al*., 2003; DE OLIVEIRA *et al*., 2014; FIGUEIREDO-FILHO *et al*., 2021).

As espécies do gênero *Centropomu*s são hermafroditas sequenciais protândricas, ou seja, nascem machos e se tornam fêmeas ao longo do seu desenvolvimento (PETERS *et al*., 1998). As espécies desse grupo são eurialinas, encontrando-se geralmente em ambientes estuarinos cuja ocorrência está relacionada com a distribuição dos ecossistemas de manguezal ao longo da costa (RIVAS, 1986; PÉREZ-PINZON, 1991; GILMORE *et al*., 1983). Essa característica tem sido evidenciada através de estudos sobre a movimentação dos robalos entre ambientes com diferentes salinidades, demonstrando que esses peixes são capazes de migrar entre água doce e salgada durante parte de seu ciclo de vida (DAROS *et al*., 2016).

Estudos com o gênero *Centropomus* têm se concentrado na avaliação de parâmetros físico-químicos do habitat, cultivo comercial, valor nutritivo de alguns ingredientes para a elaboração de rações específicas, (BARROSO *et al.*, 2002; TSUZUKI, 2008; MONTAÑO, 2009; MEZA, 2018). Diversos trabalhos com esse gênero descrevem sobre a dinâmica populacional da espécie a partir de dados como peso, idade/crescimento, dieta além de estudos com reprodução, bioecologia e criopreservação (CHAVES; NOGUEIRA, 2018; YOUNG *et al.*, 2020; COSTA; SILVA *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Trabalhos sobre sistemática molecular sugerem a presença de uma nova espécie do gênero *Centropomus* no litoral da região norte do Brasil (DE OLIVEIRA *et al*., 2014; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2019).

Estudos sobre genética populacional de espécies do gênero *Centropomus* têm sido publicados com o uso de diferentes metodologias moleculares, Anderson e Williford (2020) avaliaram padrões de estruturação populacional de três espécies predominantes no noroeste do golfo do México *C. undecimalis*, *C. mexicanus* (*C. parallelus*) e *C. poeyi* por microssatélites e identificação de espécies por sequenciamento do gene 16S do DNA mitocondrial. Três espécies de robalos foram avaliadas por aloenzimas e RAPD na região leste do Centro-Pacífico – *C. viridis, C. medius*, e *C. robalito* (DÍAZ-JAIMES *et al.*, 2007). Esse estudo revelou a existência de estruturação populacional das espécies *C. viridis* e *C. medius* e ausência de divergência genética populacional da espécie *C. robalito.* Dentre as espécies de robalo, a que mais estudos têm sido devotados é o robalo-flecha (*C. undecimalis*). Isso, talvez, por atingir maiores

dimensões e, com isso, maior interesse para pesca comercial e esportiva, essa espécie tem sido mais estudada quanto sua diversidade genética intra e interpopulacional (WILSON *et al*., 1997; TRINGALI; BERT, 1996; HERNÁNDEZ-VIDAL *et al.*, 2014; PRIOLLI *et al*., 2016; GONZALEZ, 2019; TERÁN-MARTÍNEZ *et al*., 2021).

1.2.1 *Centropomus parallelus*

Centropomus parallelus (Poey, 1860) (Figura 1), popularmente conhecido como robalo-peva ou peba, dependendo da região, distribui- se por toda costa do Atlântico, desde a Carolina do Norte (EUA) até a região sul do nosso país, já na costa do Pacífico, há relatos que o encontram do sul do México até o Peru (Figura 2) (SANTOS, 2014). A presença desta espécie em diversos locais ocorre devido a sua capacidade de se adaptar fisiologicamente a variações de salinidade, migrando entre ambientes de água doce e salgada. Além disso, o robalo-peva suporta locais de transição entre os climas tropicais e subtropicais com maior ocorrência em zonas estuarinas, onde ficam durante o período reprodutivo pois a desova ocorre exclusivamente nessa área, ressaltando a influência da geografia no comportamento destes peixes (KEITH *et al*., 2000; CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009).

Figura 1 - Robalo-peva, *Centropomus parallelus* Poey, 1860.



Fonte: Prof. Dr. Domingos Garrone Neto, 2018

Figura 2- Distribuição da espécie *Centropomus parallelus*



Fonte: International Union for Conservation of Nature- IUCN, 2022

Quando se trata da espécie *C. parallelus* a falta de informações se acentua, pois grande parte dos trabalhos abordam temas tais como hábitos alimentar, ecologia espacial, reprodução, crescimento de juvenis etc. (DA SILVA ROCHA *et al*, 2005; ANNI; PINHEIRO, 2009; TSUZUKI *et al.*, 2008; CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009; ASSIS *et al.*, 2019; CONTRERAS-GARCÍA *et al*, 2020; PINTO; NUNES, 2021; DAROS *et al*, 2022).

No Brasil, informações sobre o ciclo reprodutivo e estrutura populacional de *C. parallelus* no Sudeste são escassas e os dados disponíveis tratam de populações costeiras, normalmente associadas a baías, como por exemplo, as de Paranaguá e de Guaratuba, no Estado do Paraná (MORO, 2008; DAROS *et al*., 2016; CHAVES e NOGUEIRA, 2018). Para os Estado de São Paulo, especialmente para ambientes fluviais, dados dessa natureza ainda não estão disponíveis. Na bacia do Rio Ribeira, tanto *C. undecimalis* quanto *C. parallelus* possuem ocorrência confirmada, embora *C. parallelus* seja a espécie que predomina nos ambientes de baixa salinidade (D. Garrone-Neto, com. pess.). Essa espécie possui, inclusive, registros de capturas ocorridas a mais de 100 km à montante da foz do Rio Ribeira, em Iporanga – SP (CORRÊA *et al*., 2011).

Devido à sua esportividade quando fisgado e à qualidade da sua carne, *C. parallelus* é alvo de pescarias industriais, artesanais e amadoras no sudeste do Brasil, especialmente em São Paulo. Esse fato tem contribuído com discussões a respeito do manejo de *C. parallelus* (e seus congêneres) na região, pois já existem sinais de sobreexplotação, com a sugestão de se limitar as capturas, recuperar e conservar o hábitat da espécie (MORO *et al*., 2008; MOTTA *et al*., 2016).

Segundo dados de gerenciamento e execução do projeto de monitoramento da atividade pesqueira no estado de São Paulo-PMAP-SP (2021), a captura descarregada nos portos paulistas no segundo semestre de 2021 totalizou 21.728,94 kg de robalo-peva além disso, na região litoral sul do estado o robalo é a espécie mais procurada por pescadores esportivos, sua alta plasticidade em relação à salinidade e movimentação migratória associada a reprodução proporciona aos juvenis de *C. parallelus* a capacidade de ocupar e migrar entre diferentes hábitats, tornando-os vulneráveis à pesca (BARRELLA *et al*., 2016; DAROS *et al*., 2016; MOTTA *et al*., 2016),

Pesquisas recentes sugerem que a dinâmica espacial de espécies de robalos adultos é mais complexa do que se acreditava, com cerca de 40% de adultos permanecendo nos rios durante os meses de desova, em um estado de "repouso reprodutivo", enquanto outros se deslocam para os estuários para reproduzir (BLEWETT *et al*., 2009; TROTTER *et al*., 2012). Além disso, modificação ambiental em estuários como consequência da ocupação urbana e industrial são fatores que podem afetar a conservação e sobrevivência das populações que possuem adaptação local (BLANQUART *et al*., 2013; SORK *et al*., 2013).

Os estudos genéticos da espécie *C. parallelus* são escassos, González (2015) avaliou a distribuição da diversidade genética de três espécies do gênero *Centropomus* residentes na costa do golfo do Texas-EUA com o uso de sequências do DNA mitocondrial e microssatélites.

Outros dois trabalhos publicados abordando diversidade genética de *C. paralellus* utilizaram sequências parciais do gene citocromo b no DNA mitocondrial de indivíduos de diferentes localidades ao longo da costa brasileira (PRODOCIMO *et al*., 2008) e outro utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para caracterizar geneticamente o robalo-peva oriundo da Reserva Extrativista (RESEX) de Canavieiras – BA (FONSECA *et al.*, 2020).

1.3 JUSTIFICATIVA

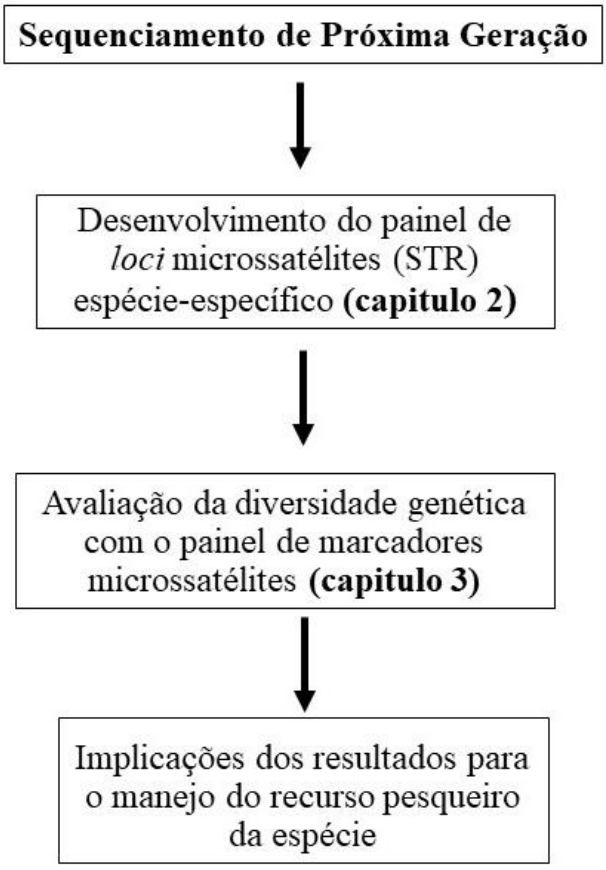
O robalo-peva apresenta um comportamento migratório no qual parte majoritária da população é estuarino-dependente, parte consiste em migrantes entre estuário e águas marinhas e uma parte menor migra entre o estuário e água doce. Sendo assim, as estimativas de fluxo gênico entre e dentro das populações estuarinas, bem com os parâmetros de diversidade genética entre e dentro estuários ainda são escassos na literatura cientifica. Por outro lado, a dispersão larval pode permitir algum tipo conexão entre populações próximas. Face ao exposto e a escassez de estudos genéticos sobre a espécie, a hipótese de estruturação populacional entre diferentes localidades (possíveis populações residentes-estuarinas) pode conferir alto grau de vulnerabilidade para *C. parallelus*, pois regiões estuarinas localizadas ao longo da costa estão geralmente sob fortes ações antrópicas. Características fisiológicas do robalo-peva como hermafroditismo sequencial e estenotermia, aliada a perda e a fragmentação de habitat, tornam a espécie particularmente sensível a ações humanas diretas tais como sobrepesca e indiretas como mudanças climáticas. Portanto, torna-se imprescindível estudos sobre a identificação e caracterização genética de populações discretas e seus níveis de diversidade genética de espécie *C. parallelus.*

1.4 OBJETIVOS

Análises com marcadores moleculares permitem a realização de inferências sobre a adaptação local de diferentes populações que vivem em ambientes marinhos com diferentes gradientes ambientais, como temperatura e salinidade. Portanto, o objetivo geral desta tese foi desenvolver e utilizar marcadores moleculares (Capítulo 2) para avaliação genética de populações do robalo-peva, *C. parallelus*, amostradas em regiões de estuários localizados no Sudeste e Sul do litoral brasileiro (Capítulo 3), a fim de testar a hipótese da existência de populações distintas de robalo-peva entre as regiões estuarinas alvo das amostragens.

1.5 APRESENTAÇÃO DA TESE

Figura 3 - Estrutura esquemática do trabalho desenvolvido com *Centropomus parallelus*, em regiões de estuários no Sudeste e Sul do litoral brasileiro e referências aos respectivos capítulos da tese.



REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

Agenda 2030, portal.stf.jus.br, 2022. Disponível em: <https://portal.stf.jus.br/hotsites/agenda-2030/>. Acesso em 17 set de 2022.

ANDERSON, J. et al. Demographic, taxonomic, and genetic characterization of the snook species complex (*Centropomus* spp.) along the leading edge of its range in the northwestern Gulf of Mexico. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 40, n. 1, p. 190-208, 2020.

ANNI, I. S. A.; PINHEIRO, P. C. Hábito alimentar das espécies de robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1986 e *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) no litoral norte de Santa Catarina e sul do Paraná, Brasil. In: **Anais do III Congresso Latino-Americano de Ecologia**. 2009.

APPLEYARD, S. A. et al. Genetic diversity and restricted genetic connectivity in an endangered marine fish (*Brachionichthys hirsutus*) provides a model for conservation management in related and data-deficient species. **Marine and Freshwater Research,** v. 72, n. 12, p. 1735-1745, 2021.

ASHIKAGA, F. Y. et al. The endangered species *Brycon orbignyannus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v.98, n.7, p.1845–1855, 2015.

ASSIS, D. A. S. D. de et al. Reproductive biology of the protandric hermaphrodite fat snook *Centropomus parallelus* Poey 1860 in a tropical estuary, northeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 54, n. 3, p. 225-235, 2019.

BALASUNDARAM, S. V. et al. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? **Fungal Biology**, v. 119, n. 10, p. 940-945, 2015.

BARRELLA, W. et al. Biological and socio-economic aspects of recreational fisheries and their implications for the management of coastal urban areas of south-eastern Brazil. **Fisheries Management and Ecology,** v. 23, n. 3-4, p. 303-314, 2016.

BARROSO, M. V. et al. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (*Centropomus parallelus).* Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, p. 2157-2164, 2002.

BENEDITO, Evanilde. Biologia e Ecologia de Vertebrados. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ: Grupo GEN, 2015. 978-85-277-2698-6. Disponível em: https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2698-6/. Acesso em: 23 jun. 2022.

BLANQUART, F. et al. A practical guide to measuring local adaptation. **Ecology letters**, v. 16, n. 9, p. 1195-1205, 2013.

BLEWETT, D. A. et al. Use of rivers by common snook *Centropomus* undecimalis in southwest Florida: a first step in addressing the overwintering paradigm. **Florida Scientist**, p. 310-324, 2009.

BRANDER, K. Impacts of climate change on fisheries**. Journal of Marine Systems**, v. 79, n. 3-4, p. 389-402, 2010.

CAMARGO, N.G. et al. Caracterização de marcadores microssatélites em plantas nativas do Cerrado brasileiro. **Multi-Science Journal**, v.1, n.6, 2016.

CARVALHO-FILHO, A. et al. A new species of snook, *Centropomus* (Teleostei: Centropomidae), from northern South America, with notes on the geographic distribution of other species of the genus. **Zootaxa**, v. 4671, n. 1, p.81-92, 2019.

CERGOLE, Maria Cristina; DIAS-NETO, José. **Plano de gestão para o uso sustentável de sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil**. Brasília: Ibama, 2011.

CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.17-28, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19189233. Acesso em: 17 Mar. 2019.

CLOUTIER, R.; ARRATIA, G. Early diversification of actinopterygians. **Recent advances in the origin and early radiation of vertebrates**, p.217-270, 2004. Disponível em:1https://www.researchgate.net/profile/Richard-Cloutier /publication/237009474_Early_diversification_of_actinopterygians/links/00b7d535ac893d2c87000000/Early-diversification-of-actinopterygians.pdf. Acesso em: 22 abr. 2021.

COLEMAN, R. A. et al. Artificial barriers prevent genetic recovery of small isolated populations of a low-mobility freshwater fish. **Heredity,** v. 120, n. 6, p. 515-532, 2018.

CONTRERAS-GARCÍA, M. de J. et al. Reproducción inducida del robalo chucumite *"Centropomus parallelus*" en Tabasco, México. **Revista AquaTIC**, n. 56, p. 15-25, 2021.

CORRÊA, C. F.; LEONARDO, A. F. G. O robalo no Vale do Ribeira, ocorrência natural e perspectivas para a criação comercial. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2011. Disponível em: http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisaetecnologia/edicao-2011/2011-janeiro-junho/849-o-robalo-no-vale-do-ribeiraocorrencianatural-e-perspectivas-para-criacao-comercial/file.html?force_download=1. Acesso em: 17 Mar. 2020.

COSTA E SILVA, G. H. et al. Reproductive biology of the fat snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860 (Teleostei, Centropomidae) and implications for its management in the southern Atlantic Ocean. **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 2, p. 669-672, 2021.

CHAVES, P. T. C.; NOGUEIRA, A. B.; Biologia reprodutiva do robalo-peva, *Centropomus parallelus* (Teleostei), na Baía de Guaratuba (Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v.47 n. 3-4, p. 69-84, 2018. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/acta/article/download/62590/36743. Acesso em 18 mar. 2019.

DA SILVA ROCHA, A. J. et al. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 316, n. 2, p. 157-165, 2005.

DAROS, F. A. et al. Migratory Patterns of *Centropomus parallelus* across Estuaries of the Abrolhos Bank Shelf as Determined by Otolith Elemental Analysis. In: **Biology and Life Sciences Forum**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 14, 2022.

DAVIES, T. D.; BAUM, J. K. Extinction risk and overfishing: reconciling conservation and fisheries perspectives on the status of marine fishes. **Scientific reports**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2012.

DE OLIVEIRA, J. N. et al. Molecular data indicate the presence of a novel species of *Centropomus* (Centropomidae–Perciformes) in the Western Atlantic. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 77, p. 275-280, 2014.

DÍAZ-JAIMES, P. et al. Comparative population structure of three snook species (Teleostei: Centropomidae) from the eastern central Pacific. **Ichthyological Research**, v. 54, n. 4, p. 380-387, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10228-007-0413-3

FALEIRO, F.G. Marcadores Genético-moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **EMBRAPA**, Planaltina, Distrito Federal, p. 12, 2007.

FAO 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation.** Rome, FAO. Disponível em: https://doi.org/10.4060/ca9229en, Acesso em: 13/08/2022.

FIGUEIREDO-FILHO, J. M. et al. Taxonomy of *Centropomus* Lacépède, 1802 (Perciformes: Centropomidae), with focus on the Atlantic species of the genus. **Zootaxa**, v. 4942, n. 3, p. zootaxa. 4942.3. 1-zootaxa. 4942.3. 1, 2021.

FONSECA V.L. et al. Migratory Patterns of *Centropomus parallelus* across Estuaries of the Abrolhos Bank Shelf as Determined by Otolith Elemental Analysis. In: **Biology and Life Sciences Forum**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 14, 2022.

FONSECA V.L. et al. Análise da diversidade genética do robalo peva (*Centropomus parallelus*) na resex de Canavieiras, Bahia. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2180-2197, 2020.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, v.326, p.22–29, 2003.

GARDNER, M. J. et al. Microsatellite-based assessment of the genetic structure of snapper, *Chrysophrys auratus*, in Australasia. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 274, p. 107932, 2022.

Gaspar, M. D. Análise das datações radiocarbônicas dos sítios de pescadores, coletores e caçadores. **Boletim do Museu Paranaense Emilio Goeldi**, 8, 81-91, 1996.

GELPKE, N. et al. World Ocean Review 2013: Living with the oceans. 2: The future of fish– the fisheries of the future. **Hamburg: Maribus gGmbH**, 2013.

GILMORE, R. G. et al. Observations on the distribution and biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Science,** v. 46, n. 3/4, p. 313-336, 1983.

GONZÁLEZ, A. (2015). *Population genetic structure of the crashed snook fishery (Centropomus spp.)* Master of Science in fisheries and mariculture Texas A&M University - Corpus Christi

GONZALEZ, J. G. et al. Trophic resource partitioning of two snook fish species (Centropomidae) in tropical estuaries in Brazil as evidenced by stable isotope analysis. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 226, p.106-287, 2019.

GREAT LAKES FISHERY COMMISSION. **Great Lakes Fishery Commission Research: Science to Inform Management.**, Commonwealth Blvd., Ann Arbor. New York, EUA 2022. Disponível em: http://www.glfc.org/science-research.php Acesso em: 28 de fevereiro de 2022

HANSEN, M. M. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (Salmo trutta) populations: An approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 6, p. 1003-1015, 2002.

HEMMER-HANSEN, J. et al. Genetic analyses reveal complex dynamics within a marine fish management area. **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 4, p. 830-844, 2019.

HERNÁNDEZ-VIDAL, U. et al. Reproductive variability of the common snook, *Centropomus undecimalis*, in environments of contrasting salinities interconnected by the Grijalva–Usumacinta fluvial system. **Ciências Marinas**, v.40, n. 3, p.173-185, 2014.

HICKMAN, C. P. et al. Princípios Integrados de Zoologia 16 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2016.

HILBORN, R.; STOKES, K. Defining overfished stocks: have we lost the plot?. **Fisheries**, v. 35, n. 3, p. 113-120, 2010.

HILSDORF, A.W.S. et al. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. **Embrapa Pantanal,** 2006**.** Disponível em: https://revistas.ufpr.br/acta/article/download/62590/36743. Acesso em 18 Mar. 2019.

INSTITUTO DE PESCA (IP), Programa de Monitoramento da Atividade Pesqueira Marinha e Estuarina do Estado de São Paulo PMAP-SP, **Relatório Técnico Semestral do PMAP-SP.** São Paulo, 2022. Disponível em: http://www.propesq.pesca.sp.gov.br/arquivos/pagina/1690646681_220525_PMAP-SP_1322_Rev_00.pdf . Acesso em: 17 Fev de 2022.

IUCN Red List of Threatened Species. ***Centropomus parallelus***. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T190327A1948008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20152.RLTS.T190327A1948008.en. Acesso em 03 Mai. 2022.

KEITH, P. et al. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (Tome 2- Fascicule I, Batrachoidiformes, Mugiliformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Perciformes, Pleuronectiformes, Tetraodontiformes). **Collection patrimoines naturels**, 2000.

KELLER, I. et al. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. **Molecular Ecology**, v.22, n. 11, p.2848-2863, 2013.

KENCHINGTON, E. L. The Effects of Fishing on Species and Genetic Diversity. **Responsible fisheries in the marine ecosystem**, p. 235, 2003.

KERR, L. A. et al. Lessons learned from practical approaches to reconcile mismatches between biological population structure and stock units of marine fish. **ICES Journal of Marine Science**, v. 74, n. 6, p. 1708-1722, 2017.

LI, Y. L. et al. Population genomic signatures of genetic structure and environmental selection in the catadromous roughskin sculpin Trachidermus fasciatus. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 7, p.1751-1764, 2019.

LIMA, T. A. Em busca dos frutos do mar os pescadores-coletores do litoral centro-sul do Brasil. **Revista USP**, v. 44, p. 270-327, 1999.

MACARIO, K. D. et al. Chronological model of a Brazilian Holocene shellmound (Sambaqui da Tarioba, Rio de Janeiro, Brazil). **Radiocarbon**, v. 56, n. 2, p. 489-499, 2014.

MAROSO, F. et al. RAD SNP markers as a tool for conservation of dolphinfish Coryphaena hippurus in the Mediterranean Sea: Identification of subtle genetic structure and assessment of populations sex-ratios. **Marine Genomics**, v. 28, p. 57-62, 2016.

MELNYCHUK, M. C.; Peterson, E.; Elliott, M., & Hilborn, R. Fisheries management impacts on target species status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 1, p. 178-183, 2017.

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

MEZA, E. Z.; Crecimiento del robalo y el chucumite en agua dulce en el estado de Veracruz, México/Growth of the snook and chucumite in fresh water in the state of Veracruz, Mexico. **CIBA Revista Iberoamericana de las Ciências Biológicas y Agropecuárias**, v. 7, n. 14, p. 1-12, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE MMA. (2022) **Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022, Anexo II. Diário Oficial da União 108, de 08 de junho de 2022, Seção 1, página 105-116.

MONTAÑO, O. J. F. Assessing the Habitat Structure for Common Snook (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) and Tarpon (Megalops atlanticus Valenciennes, 1847) in Santa Teresa Lagoons, Puerto Rico. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, n. 2, 2009.

MOTTA, F. S. et al. Collaborative assessment of recreational fishing in a subtropical estuarine system: a case study with fishing guides from south-eastern Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 23, n. 3-4, p. 291-302, 2016.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **Os objetivos de desenvolvimento sustentável no Brasil**. Brasília, DF, Brasil, 2022. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/14>. Acesso em: 18 set. 2022

NASCIMENTO, I. R. M. A. et al. Food and Reproductive Bioecology as a subsidy for the cultivation of the fish Centropomus undecimalis (Teleostei: Centropomidae) in Brazil: A Systematic Review**. Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 16, p. e592101623893, 2021. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23893. Acesso em: 20 set. 2022.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2009. Ocean Science Series. Washington, DC: The National Academies Press. https://doi.org/10.17226/13353.

NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016. Disponível em: https://play.google.com/books/reader?id=E-LDAAAQBAJ&hl=pt_BR&pg=GBS.PP1. Acesso em: 26 abr. 2021.

OLIVEIRA, C. et al. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

OVENDEN, Jennifer R. et al. Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. **Fish and Fisheries**, v. 16, n. 1, p. 125-159, 2015.

PACHECO-ALMANZAR, E. et al. Do the fish scales shape of *Mugil curema* reflect the genetic structure using microsatellites markers and the Mexican marine ecoregions classification?. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 166, 2020.

PÉREZ-PINZON, M. A.; LUTZ, P. L. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). **Bulletin of Marine Science**, v. 48, n. 1, p. 58-66, 1991.

PETERS, K. M. et al. Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. **Bulletin of Marine Science**, v. 62, n. 2, p. 509-529, 1998.

PIKITCH, E. K. et al. The global contribution of forage fish to marine fisheries and ecosystems. **Fish and Fisheries**, v. 15, n. 1, p. 43-64, 2014.

PINTO, R. C. C.; NUNES, A. J. P.; Growth of juveniles of the fat snook, *Centropomus parallelus*, in response to dietary lipid, energy and protein. **Arquivo De Ciências Do Mar**. fortaleza, v. 54, n. 2, p.7-23. 2021.

POLAZ, C. N. M.; RIBEIRO, K. T. Conservação de peixes continentais e manejo de unidades de conservação. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil,** n. 1, p. 1-3, 2017.

PRIOLLI, R. H. et al. Population genetic structure of an estuarine and a reef fish species exploited by Brazilian artisanal fishing. **Scientia Marina**, v. 80, n. 4, p. 467-477, 2016.

PRODOCIMO, V. et al. Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 8, p. 2075-2082, 2008.

RIVAS, L. R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, n. 3, p. 579-611, 1986.

ROSSI, A. R. et al. Influence of hydrodynamic connectivity on the genetic structure and gene flow of the common pandora *Pagellus erythrinus*. **Hydrobiologia** v. 834, p. 103–117, 2019.

SANTOS, M. B. et al. Quantifying the predation on sardine and hake by cetaceans in the Atlantic waters of the Iberian Peninsula. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 106, p. 232-244, 2014.

SANTOS, V. L. M. **Biologia reprodutiva e transição sexual do robalo-peva (*Centropomus parallelus):* aspectos relevantes para a conservação da espécie**. 2014. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ. Disponível em: Acesso em: http://ppgciac.macae.ufrj.br/images/Disserta%C3%A7%C3%B5es/Vagner_Leonardo_Maced

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. **Nature Reviews Genetics**, v. *5*, n. 1, p. 63-69, 2004.

SERCHUK, F. M.; WIGLEY, S.E. Assessment and management of the Georges Bank cod fishery: an historical review and evaluation. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 13, 1992.

SOBRINO, B. et al. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2-3, p. 181-194, 2005.

SORK, V. L. et al. Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, n. 4, p. 901-911, 2013.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.199-203, 2000.

TERÁN-MARTÍNEZ, J. et al. Molecular Characterization of the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) in the Usumacinta Basin. **Diversity**, v. 13, n. 8, p. 347, 2021.

TONELLA, L. H. et al. NEOTROPICAL FRESHWATER FISHES: A dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the Neotropics. 2022.

TRINGALI, M. D.; BERT, T. M. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53, n. 5, p. 974-984, 1996.

TROTTER, A. A. et al. Migrations of common snook from a tidal river with implications for skipped spawning. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 141, n. 4, p. 1016-1025, 2012.

TSUZUKI, M. Y. et al. Growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* in cages at three stocking densities. **B. Inst. Pesca**, p. 319-324, 2008.

VALDEZ-MORENO M. et al. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. **Marine and Freshwater Research**, v. 61, n. 6, p. 655-671, 2010.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, v. 1, p. 1-12, 1998.

VASCONCELLOS, M. **Ecosystem impacts of fishing forage fishes: an analysis of harvest strategies for the brazillian sardine**. 2000. Tese de Doutorado. University of British Columbia, 2000.

WAGNER, G. et al. Sambaquis (shell mounds) of the Brazilian coast. **Quaternary International**, v. 239, n. 1-2, p. 51-60, 2011.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the n. number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular ecology**, v. 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, n. 1, p. 191-201, 2000.

WILEY, E. O.; JOHNSON, G. D. A teleost classification based on monophyletic groups. **Origin and phylogenetic interrelationships of teleosts**, 2010.

WILSON JR, R. R. et al. Mitochondrial DNA control region of common snook and its prospect for use as a genetic tag. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 4, p. 594-606, 1997.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

YOUNG, J. M. et al. Maturation of female common snook *Centropomus undecimalis*: implications for managing protandrous fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 97, n. 5, p. 1317-1331, 2020.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LÓCUS MICROSSATÉLITES E SNPS DA ESPÉCIE *Centropomus parallelus* POR SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO

Letícia Rafaela de Morais[1]; Danilo de Assunção Vitoriano[1]; Caio Augusto Perazza[1]; Domingos Garrone Neto[2]; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf[1]

[1]Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

Autor correspondente:
Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.
wagner@umc.br, +55 11 4798-7210

RESUMO

O robalo-peva (*Centropomus parallelus*) é uma espécie de peixe ósseo de grande importância econômica, tanto para as pescarias comerciais quanto para as amadoras. A espécie é hermafrodita sequencial protândrica e está amplamente distribuída pela costa brasileira. No entanto, não conta com uma legislação abrangente e que leve em consideração tais características, delimitando o tamanho mínimo e máximo de captura. Para isso, é necessário entender a dinâmica populacional da espécie e como suas populações estão distribuídas. Os microssatélites são marcadores moleculares que se tornaram uma das ferramentas mais populares em estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e sua relativa facilidade de obtenção, sendo possível analisar a variabilidade genética das populações amostradas. No presente trabalho obtivemos desenvolver um painel de 15 lócus polimórficos para a espécie *C. parallelus*. O estudo contou com a amostra de 30 indivíduos das cidades de Guaratuba-PR, Cubatão-SP e Florianópolis-SC, sendo submetidas ao método de extração salina de DNA, o qual foi quantificado e avaliado quanto a sua pureza. Foram testados inicialmente 40 *loci* di, tri e tetranucleotídeos para seleção de 15 *loci* polimórficos, utilizando todas as amostras para serem amplificadas e genotipadas com o equipamento Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) para posterior análise estatística. Todos os microssatélites apresentados foram testados a fim de identificar os mais polimórficos, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Até o momento foram encontrados 15 lócus classificados como polimórficos, sendo 7 di, 3 tri- e 5 tetra-nucleotídeos. Em geral os resultados de PIC (Conteúdo Polimórfico Informativo) obtidos variaram de 0,341 a 0,852, com uma média de 0,637, o que indica que os *loci* propostos são altamente informativos, exceto o *locus* CEP38 e CEP12 cujo de 0,341 e 0,485 respectivamente, classificados como mediano. Com a aplicabilidade desse painel em trabalhos futuros será possível entender a conectividade das populações amostradas e propor estratégias que visem o ordenamento das suas capturas, com reflexos positivos a conservação desse importante recurso genético no Brasil.

Palavras-chave: Conteúdo polimórfico informativo, sequências curtas repetidas, genética de populações, ordenamento pesqueiro, Centropomidae.

ABSTRACT

The fat snook (*Centropomus parallelus*) is a species of bony fish of great economic importance to commercial and sport fisheries. The species is a protandric sequential hermaphrodite widely distributed along the Brazilian coast. However, no comprehensive legislation considers these characteristics, especially concerning maximum catch size. For this, it is necessary to understand the population dynamics of the species and how its populations are genetically structured. Microsatellites are molecular markers that have become one of the most popular tools in genetic studies due to their high polymorphism and relative ease of obtaining, being possible to analyze the genetic variability of the sampled populations. In the present study, 30 individuals from the regions of Guaratuba-PR, Cubatão-SP, and Florianópolis-SC were sampled and submitted to the DNA saline extraction method, which was quantified and evaluated for purity. Initially, 40 di-, tri- and tetranucleotide *loci* were tested to select 15 polymorphic *loci*. All samples were amplified and genotyped with the Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) equipment for later statistical analysis. All microsatellites presented were tested to identify the most polymorphic ones using the polymerase chain reaction (PCR) technique. So far, 15 *loci* were classified as polymorphic, 7 di-, 3 tri-, and 5 tetra-nucleotides. The PIC (Polymorphic Informative Content) results ranged from 0.341 to 0.852, with an average of 0.637, indicating that the proposed *locus* are highly informative, except for the CEP38 and CEP12 *locus* whose PIC was 0.341 and 0.485 respectively, classified as average. We obtained a panel of 15 polymorphic *loci* in the present study for the species *C. parallelus*. With the applicability of this panel in future work, it will be possible to understand the connectivity of the sampled populations and propose strategies that aim to order their catches, with positive effects on the conservation of this important genetic resource in Brazil.

Keywords: polymorphic information content, short repeated sequences, population genetics.

2. INTRODUÇÃO

Centropomus parallelus (POEY, 1860) é uma espécie de peixe ósseo muito apreciada no ramo gastronômico e de grande importância tanto na pesca esportiva quanto na pesca comercial, sua taxonomia se submete à classe Actinopterygii, ordem Perciformes, pertencente à família Centropomidae (MENDONÇA *et al*., 2015). Essa espécie desperta grande interesse em pescadores esportivos além de ser uma das principais fontes de renda para pescadores artesanais em alguns locais do estado de São Paulo (OSTINI *et al*., 2007), portanto é imprescindível ressaltar sua importância econômica.

Desde a década de 1970 o uso de marcadores genéticos tem sido utilizado para evidenciar a variabilidade dentro e entre populações possibilitando a compreensão dos processos que levam algumas espécies ao isolamento e adaptação de populações locais (HILSDORF; HALLERMAN, 2017). Entre esses marcadores podemos citar os microssatélites, conhecido também como STR ("*Short Tandem Repeats*"), que se tornou um dos marcadores moleculares mais populares em vários estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e sua relativa facilidade de obtenção, o que justifica duas de suas principais características que o fazem de grande interesse nesses estudos (FERGUSON *et al*., 1995; ZANE *et al*., 2002; MADESIS *et al.*, 2013;). Essas regiões contendo repetições curtas são conservadas dentro de uma espécie e podem ser amplificadas por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na qual são desenhados iniciadores nas regiões que flanqueiam um STR (LANZA *et al*., 2000).

Tratando-se da espécie *C. parallelus*, a escassez de informações se acentua, pois grande parte dos trabalhos sobre a ecologia espacial e genética de populações de robalos é voltada para a espécie *Centropomus undecimalis*, pois essa atinge as maiores dimensões dentre os representantes do gênero *Centropomus* e tem sido amplamente estudada na Flórida e no Texas, nos Estados Unidos (TRINGALI; BERT, 1996; WILSON *et al*., 1997; HERNANDEZ-VIDAL *et al*., 2014; GONZÁLEZ, 2015).

Face a importância ecológica e econômica da espécie *C. paralellus* e à falta de estudos sobre genética de populações, pretende-se gerar um painel específico de marcadores microssatélites para pesquisas futuras, a fim de concentrar esforços para fornecer dados que possam subsidiar políticas públicas para conservação da espécie em questão

2.1 MATERIAL E MÉTODO

2.1.1 Sequenciamento, desenvolvimento e seleção de marcadores microssatélites

DNA genômico foi extraído da nadadeira caudal de um indivíduo de *C. parallelus*, utilizando o kit *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA) e posteriormente enviado para o Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP para sequenciamento. O processo de isolamento dos lócus microssatélites (STR) para a espécie foi realizado primeiramente com a preparação de bibliotecas genômicas com leituras pareadas (paired-end) com o kit Nextera® DNA (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas em duas *lanes* no equipamento NextSeq2000 da Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA) com uma profundidade de 10x o tamanho do genoma. A sequência de análises foi realizada com o pacote CASAVA v1.8.2 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) para proceder a chamada de bases dos dados brutos e convertê-los em sequências de nucleotídeos (*reads*) no formato FastQC. Este procedimento é um passo importante para verificar as pontuações de qualidade Phred (EWING; HILLIER; WENDL, 1998). O pacote SeqyClean v1.10.06 (ZHBANNIKOV *et al*., 2017) foi usado para excluir fragmentos que apresentassem qualidade ≤ 24 numa escala Phred em mais da metade das chamadas de bases.

Em seguida, as sequências foram submetidas à análise no programa FastQC 0.11.5 (ANDREWS, 2010) para filtragem de bases com qualidade baixa. A filtragem dos adaptadores Illumina foi realizada com o programa BBDuk, uma ferramenta do pacote BBTools 37.02 (http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/), de modo que sequências menores que 75 pares de bases foram removidas das análises posteriores. O rascunho do genoma da espécie foi montado com auxílio do programa MEGAHIT 1.1.1 (LI *et al*., 2015), utilizando-se kmers variando de 21 a 71 pares de bases. As sequências foram então submetidas ao programa BatchPrimer3 (YOU *et al.*, 2008) para identificação das que contém STR, bem como desenho dos primers para posterior amplificação via PCR. Foram testados inicialmente 40 *loci* di, tri e tetranucleotídeos para seleção de 15 *loci* polimórficos. Os seguintes parâmetros foram usados para escolha dos *locus*: (i) temperatura de anelamento entre 52°C e 64°C, (ii) tamanho dos amplicons entre 120 e 180 pb, (iii) número de repetições por loci de 7 a 15, (iv) conteúdo GC entre 40 e 60% e (v) tamanho dos primers entre 18 e 21 pares e bases. Após isso os primers filtrados foram submetidos à análise de estabilidade físico-química com auxílio da ferramenta DNA OligoAnalyzer (OWCZARZY *et al*., 2008) para seleção das sequências mais adequadas

2.1.2 Caracterização dos *loci* microssatélites

Para caracterização e seleção dos lócus STR, 30 amostras de nadadeira caudal das regiões de Guaratuba-PR, Cubatão-SP e Florianópolis-SC foram utilizadas, sendo 10 de cada localidade para os testes de polimorfismo. O DNA das amostras foi extraído da nadadeira caudal, seguindo o protocolo de Extração Salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) posteriormente, a verificação da qualidade e da integridade do DNA foi feita por meio de gel de agarose a 1,0 % e, em seguida, corrido em eletroforese horizontal, utilizando o marcador de peso molecular 1 kb (Low DNA Mass Ladder Invitrogen). Fatores como pureza (260nm/280nm) e concentração (em ng/µL) do material extraído foram verificados por densidade óptica em espectrofotômetro (NANOVUE DNA da GE Healthcare®). Essas amostras foram avaliadas para a validação do painel de marcadores microssatélites específicos para a espécie, 15 lócus apresentaram evidências de polimorfismo. Para cada conjunto de primer, o primer forward foi projetado acrescentando a sequência universal M13 (5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3 ′) como uma cauda 5 ′ (SCHUELKE, 2000). As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um volume final de 25 µL (~ 20/ ng/µL de DNA genômico, 2,0 µL de buffer com Cloreto de potássio KCl, 1,8 µL de dNTP à 10mM, 10mM de cada iniciador, em relação às concentrações de Cloreto de magnésio (MgCl2) alguns testes foram feitos variando entre 1,5; 2,0 e 2,5 mM, 0,5 U Taq DNA polimerase, 0,2 µM de primer universal M13 marcado com fluorescência IRDye700 e 10 µM de cada um dos iniciadores foward e reverse no equipamento Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

O protocolo de amplificação para todos os marcadores consistiu em uma desnaturação inicial a 95 ° C por 180s, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30s, 60s na temperatura de anelamento (ver Tabela 1) e 72 ° C por 60 s, terminando com uma extensão final a 72°C por 420s. Os amplicons resultantes foram corridos em um gel de poliacrilamida 6,5% em um sequenciador de DNA automático (DNA Analyzer 4300; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Os alelos foram identificados usando um marcador de 50-350 bp (LI-COR Biosciences), e os genótipos foram analisados usando o software SAGA v.3.3 (LI-COR Biosciences).

2.1.3 Análises estatísticas

Os lócus microssatélites selecionados foram testados em relação à presença de alelos nulos com o pacote MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al*., 2004), o equilíbrio

de Hardy-Weinberg com o pacote HW-Quickcheck (KALINOWSKI, 2006) e a evidência de desequilíbrio de ligação entre os lócus (LD) com a utilização do pacote GENEPOP ON THE WEB 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A diversidade genética foi estimada pelo número de alelo por lócus, riqueza alélica, coeficiente de endogamia, heterozigosidade observada e esperada e número de alelos privativos, com os pacotes diveRsity (KEENAN *et al*., 2013) e DEMEtics do programa R (R Development Core Team, 2015) e o valor do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC - Polymorphic Information Conten) de cada *locus* foi avaliado com o uso do pacote Cervus v.3.0.7 (KALINOWSKI *et al*., 2007). Foram escolhidos *loci* com PIC acima de 0,25.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta marcadores microssatélites espécie-específicos padronizados para a espécie *C. paralleus*, esses foram utilizados em estudos populacionais, permitindo a compreensão da estrutura populacional desta espécie. Com genotipagem dos *loci* (Figura 4 e 5) foi encontrada uma variação no número de alelos por *locus* de 03 (CEP37) a 14 (CEP04), com valores médios de 6,66 alelos por *locus*. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) demonstra a qualidade do marcador utilizado nos estudos genéticos sendo classificado de acordo com seus níveis, valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,50 medianos e inferiores a 0,25 pouco informativos (BOTSTEIN *et al*., 1980).

Os resultados de PIC obtidos na Tabela 1 variou de 0,341 a 0,852, com uma média de 0,637 o que indica que os *loci* propostos são altamente informativos, exceto o *locus* CEP38 e CEP12 cujo PIC foi de 0,341 e 0,485 respectivamente, classificados como mediano. O Desequilíbrio de Ligação é um parâmetro que indica se dois *locus* apresentam algum tipo de ligação, que na prática pode ser traduzido como ambos os *locus* apresentarem a mesma informação acerca da variabilidade genética exigindo a escolha de um ou outro *locus* no estudo populacional. (LEWONTIN; KOJIMA, 1960; HARTL; CLARK, 2010)

O programa GENEPOP aplica um teste estatístico (*log likelihood ratio statistic*) na qual a hipótese nula é de que os genótipos observados em um *locus* são independentes dos genótipos observados no outro. Para exemplificar, observando a tabela 2, podemos observar que o lócus CEP04 está em desequilíbrio de ligação com os lócus CEP09 e CEP28, indicando que o lócus CEP04 não deve ser utilizado em conjunto com CEP09, CEP 14 e CEP28 em estudos populacionais. O mesmo ocorre com o *locus* CEP15 em desequilíbrio de ligação com CEP28 e CEP36, CEP14 com os *locus* CEP28, CEP12 e CEP29.

Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6,5%, com amostras de DNA avaliadas no aparelho DNA Analyzer 4300 e programa SAGA demonstrando a genotipagem das amostras e seus respectivos alelos.

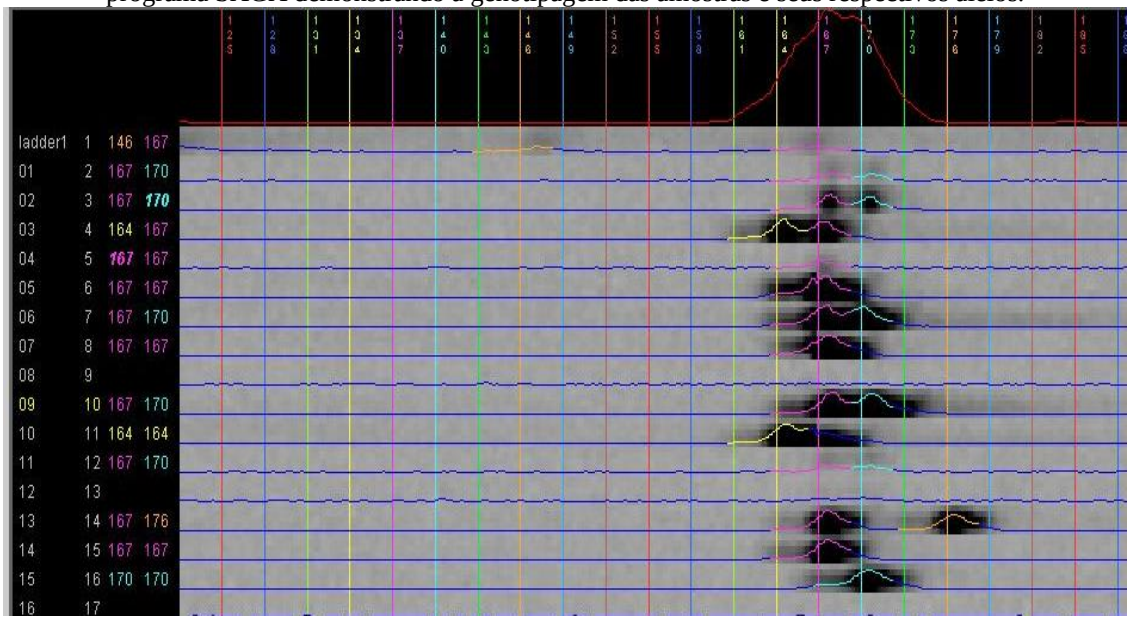


Figura 5 - Confirmação dos picos com a média geral do locus (vermelho), média da amostra (branco) entre o analisado pelo aparelho (azul) e observador (azul e vermelho). A: pico representando indivíduos heterozigotos. B: picos representando indivíduos homozigotos

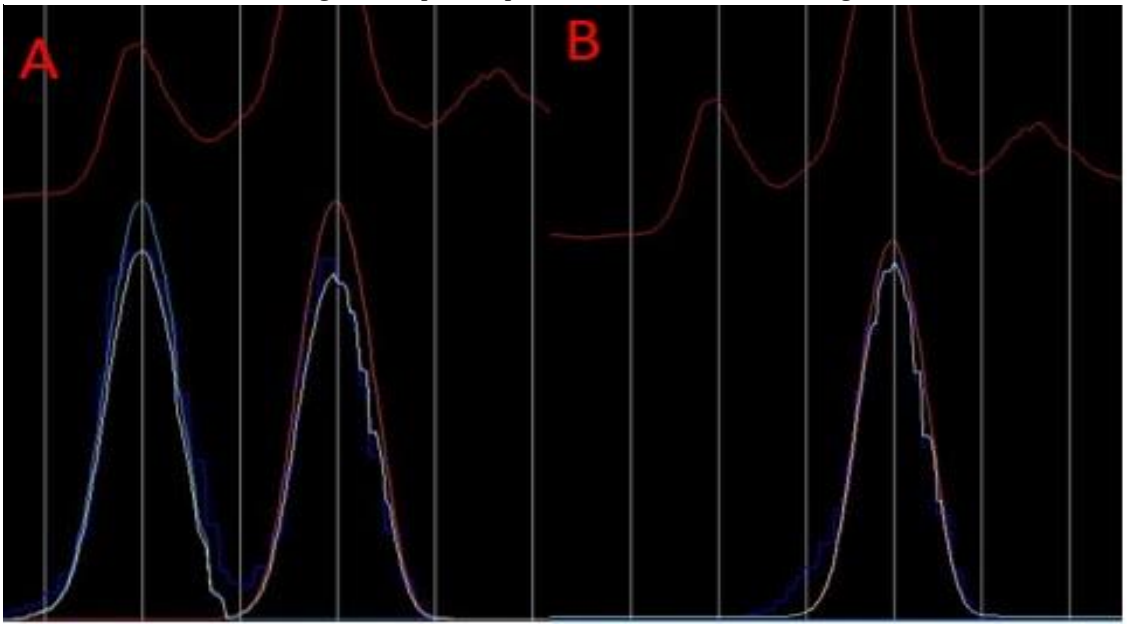


Tabela 1 - 15 *locus* polimórficos específicos para espécie *Centropomus parallelus*.

Loci	Sequência Iniciadores (5' - 3')	Ta (°C)	*Motif*	N	A	Aa	Ar	Ho	He	EHW	PIC
CEP04	*TGCTCCTCTTGCTCCTCTCTTTC CTTTGCAAGCCTTTCCCTGGT	60	TG	24	14	177-229	13,708	0,583	0,855	***	0,824
CEP09	*CGGGGTCTCAAAGTGTGTGTG ACCAACAGCATGGGTGAGCA	58	TG	24	8	158-206	7,832	0,667	0,719	NS	0,659
CEP18	*TGCTCGTCCTATTTAATGCCAGT ACAGCAGAGCACCCATCCTGA	60	CA	25	12	162-210	11,600	0,600	0,877	***	0,844
CEP26	*TCCTGTCCTGGCACAAGATGC GGACTGCTTGGAGCGTCAGAA	58	AGG	24	7	139-181	6,957	0,625	0,807	NS	0,760
CEP28	*GACCGTCCTTGACCTGCCTCT GTGCACCAGCTCTCATGCAAA	60	ACA	24	6	187-211	5,999	0,625	0,764	***	0,713
CEP29	*GTGTTGTGCATCCTCGGTTCA GGACGTGAAAACACATGCCAAG	60	ATA	29	3	148-190	3,000	0,655	0,602	NS	0,508
CEP31	*CCCAATTTCCCTCTTCGGATT GCAAAGGGGAAGAACATCCTTT	60	ATCC	24	6	153-193	5,875	0,542	0,582	NS	0,507
CEP36	*TCCTGAGCGAGGTCAGACAGC TTTGATGCAGTGTGGCATGGT	60	AAGA	23	4	171-173	4,000	0,304	0,745	***	0,678
CEP37	*ACGTCAGCTCGACTCCCTCAA CACATCCCTGATGGGGAGAGA	60	CCCT	24	3	142-182	2,999	0,333	0,401	NS	0,341
CEP38	*TGTGGAAGTTTAGCTAGCGCAGA TTGACTTGAGCAACGGCGATT	58	AAGG	28	5	190-222	4,643	0,464	0,612	NS	0,524
CEP12	*TGTGGAAGTTTAGCTAGCGCAGA TTGACTTGAGCAACGGCGATT	60	GT	24	4	145-185	3,987	0,210	0,530	***	0,485
CEP13	*TTGTTGGGTTTGCGTTGCTTT GGCTGAAACAAAGGGTCCACA	58	CA	26	4	148-190	3,808	0,270	0,650	***	0,585
CEP14	*GGGTAAGGGTTTGGGTTAGGC AACGATTAATGGAGGCTGCAA	60	TG	21	7	159-211	7,000	0,480	0,710	***	0,678
CEP15	*CTGAAGCCAACCATCCTGTCG GTCCTCCCACAGTCTGCGTCA	58	GT	26	6	175-203	5,615	0,460	0,640	***	0,598
CEP33	*TTCCCTCCGGGGATGAATAAA TTGAGTTGTGGCCAAAAATGTTC	60	ATCT	21	11	111-239	11,000	0,190	0,870	***	0,852

*TGTAAAACGACGGCCAGT (sequência da cauda m13 inserida na região 5', Ta(°C): temperatura de anelamento; N: número de amostras; A: número de alelos; Aa: tamanho do amplicon; Ar: riqueza alélica; Ho: Heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; PIC: conteúdo de informação polimórfica

Tabela 2 - Análise par a par realizada no programa GENEPOP para verificação dos *loci* que se encontram em desequilíbrio de ligação.

***Locus*#1**	***Locus*#2**	**P-Valor**	**S.E.**
CEP04	CEP28	0,0005	0,0005
CEP09	CEP14	0,0007	0,0007
CEP09	CEP29	0,0036	0,0011
CEP04	CEP14	0,0096	0,0038
CEP36	CEP15	0,0184	0,0028
CEP28	CEP15	0,0200	0,0052
CEP04	CEP09	0,0245	0,0121
CEP38	CEP12	0,0279	0,0033
CEP31	CEP37	0,0317	0,0036
CEP29	CEP31	0,0340	0,0048
CEP37	CEP12	0,0400	0,0037
CEP28	CEP14	0,0442	0,0084
CEP12	CEP14	0,0445	0,0058
CEP29	CEP14	0,0467	0,0055
CEP09	CEP28	0,0778	0,0154
CEP37	CEP14	0,0900	0,0066
CEP26	CEP37	0,0946	0,0096
CEP37	CEP33	0,0965	0,0092
CEP18	CEP29	0,0996	0,0155
CEP04	CEP18	0,1291	0,0301
CEP31	CEP33	0,1453	0,0110
CEP09	CEP15	0,1897	0,0211
CEP36	CEP12	0,2049	0,0070
CEP04	CEP15	0,2217	0,0279
CEP31	CEP15	0,2319	0,0191
CEP04	CEP13	0,2348	0,0231
CEP31	CEP14	0,2727	0,0186
CEP04	CEP33	0,2883	0,0360
CEP26	CEP28	0,2905	0,0214
CEP37	CEP15	0,3224	0,0127

CEP18	CEP36	0,3285	0,0202
CEP13	CEP15	0,3341	0,0218
CEP18	CEP12	0,3360	0,0275
CEP28	CEP13	0,3432	0,0180
CEP36	CEP38	0,3438	0,0127
CEP18	CEP37	0,3528	0,0230
CEP09	CEP12	0,3695	0,0165
CEP15	CEP33	0,3709	0,0308
CEP18	CEP28	0,3844	0,0382
CEP04	CEP36	0,3916	0,0209
CEP38	CEP15	0,4261	0,0270
CEP26	CEP31	0,4317	0,0270
CEP26	CEP33	0,4345	0,0354
CEP18	CEP33	0,4351	0,0358
CEP04	CEP37	0,4523	0,0186
CEP26	CEP13	0,4697	0,0249
CEP14	CEP15	0,4712	0,0236
CEP31	CEP12	0,5082	0,0139
CEP28	CEP29	0,5154	0,0178
CEP28	CEP31	0,5175	0,0179
CEP37	CEP38	0,5199	0,0100
CEP26	CEP12	0,5252	0,0251
CEP09	CEP37	0,5263	0,0151
CEP38	CEP14	0,5356	0,0155
CEP04	CEP26	0,5392	0,0397
CEP09	CEP13	0,5539	0,0188
CEP18	CEP31	0,5560	0,0324
CEP38	CEP33	0,5695	0,0207
CEP29	CEP37	0,5752	0,0105
CEP28	CEP37	0,5779	0,0141
CEP09	CEP18	0,5830	0,0398
CEP28	CEP12	0,5927	0,0190
CEP26	CEP29	0,5986	0,0174
CEP09	CEP31	0,6063	0,0177

CEP26	CEP14	0,6068	0,0236
CEP09	CEP26	0,6487	0,0311
CEP29	CEP12	0,6552	0,0106
CEP29	CEP38	0,6603	0,0112
CEP29	CEP33	0,6620	0,0161
CEP31	CEP38	0,6806	0,0147
CEP29	CEP15	0,6940	0,0178
CEP12	CEP13	0,6988	0,0117
CEP31	CEP13	0,7179	0,0170
CEP09	CEP36	0,7390	0,0134
CEP36	CEP37	0,7531	0,0064
CEP04	CEP31	0,7743	0,0225
CEP18	CEP38	0,7907	0,0231
CEP04	CEP29	0,8317	0,0194
CEP09	CEP33	0,8664	0,0153
CEP26	CEP15	0,8707	0,0197
CEP28	CEP38	0,8934	0,0117
CEP29	CEP36	0,9162	0,0043
CEP04	CEP12	0,9185	0,0114
CEP12	CEP15	0,9194	0,0076
CEP29	CEP13	0,9207	0,0056
CEP12	CEP33	0,9350	0,0081
CEP26	CEP38	0,9519	0,0084
CEP28	CEP36	0,9530	0,0055
CEP13	CEP33	0,9572	0,0080
CEP13	CEP14	0,9682	0,0039
CEP09	CEP38	0,9889	0,0028
CEP37	CEP13	0,9901	0,0014
CEP04	CEP38	0,9912	0,0046
CEP38	CEP13	0,9932	0,0014
CEP36	CEP13	0,9936	0,0011
CEP18	CEP26	1,0000	0,0000
CEP26	CEP36	1,0000	0,0000
CEP31	CEP36	1,0000	0,0000

CEP18	CEP13	1,0000	0,0000
CEP18	CEP14	1,0000	0,0000
CEP36	CEP14	1,0000	0,0000
CEP18	CEP15	1,0000	0,0000
CEP28	CEP33	1,0000	0,0000
CEP36	CEP33	1,0000	0,0000
CEP14	CEP33	1,0000	0,0000

2.4 CONCLUSÃO

O painel de marcadores microssatélites construídos especificamente para *C. parallelus* proposto no presente trabalho é o primeiro para a espécie em questão. A relação de 20 lócus STR polimórficos será uma ferramenta válida e eficiente para acessar a diversidade genética e por conseguinte monitorar populações de *C. parallelus* em futuras avaliações. Esses lócus foram usados para estimar as populações amostradas no Capítulo 2.

REFERÊNCIAS

ALJANABI, S.; MARTINEZ, I.; Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4692-4693, 1997.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc. Acesso em: 04 mai. 2019.

BOTSTEIN D. et al. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**. v. 32, p. 314-331, 1980.

CZORLICH, Y. et al. Rapid evolution in salmon life history induced by direct and indirect effects of fishing. **Science**, v. 376, n. 6591, p. 420-423, 2022.

FERGUSON, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 103-126, 1995.

GONZÁLEZ, A. **Population genetic structure of the crashed snook fishery (*Centropomus* spp.).** Thesis (Master of Science in Fisheries and Mariculture) - Texas A&M University. Corpus Christi, 2015. Disponível em: https://tamucc-ir.tdl.org/handle/1969.6/631. Acesso em: 20 jun 2021.

GONZÁLEZ, Alin. Population genetic structure of the crashed snook fishery (Centropomus spp.). Thesis (Master of Science in Fisheries and Mariculture) - Texas A&M University. Corpus Christi, 2015. Disponível em: https://tamucc-ir.tdl.org/handle/1969.6/631. Acesso em: 20 mai. 2019.

HERNÁNDEZ-VIDAL, U. et al. Reproductive variability of the common snook, *Centropomus undecimalis*, in environments of contrasting salinities interconnected by the Grijalva–Usumacinta fluvial system. **Ciências Marinas**, v.40, n. 3, p.173-185, 2014.

HILSDORF, Alexandre Wagner Silva; HALLERMAN, E.M. **Genetic resources of neotropical fishes**. 1.ed. Editora: Springer, 2017.

KALINOWSKI, S. T. hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy–Weinberg expectations. **Molecular Ecology Notes**, v.6, n.4, p.974-979, 2006.

KALINOWSKI, S. T. et al. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n.5, p. 1099-1106, 2007.

KEENAN, K. et al. diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors, **Methods in Ecology and Evolution**, 2013.

LANZA, M. A. et al. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo**, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LEWONTIN, R. C.; KOJIMA, K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. **Evolution**, p. 458-472, 1960.

LI, D. et al. MEGAHIT: an ultra-fast singlenode solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n.10, p. 1674-1676, 2015.

MADESIS, P. et al. Microsatellites: Evolution and Contribution. Microsatellites: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**, v. 1006, c.13, 2013.

MENDONÇA, J. T. et al. ***Centropomus parallelus***. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T190327A1948008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20152.RLTS.T190327A1948008.en. Acesso em 03 mai. 2019.

NEUENHOFF, R. D. et al. Continued decline of a collapsed population of Atlantic cod (*Gadus morhua*) due to predation-driven Allee effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 76(1), 168-184, 2019. https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0190

OSTINI, S. et al. Criação do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) submetido a diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n. 3, 2007.

OWCZARZY, R. et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, 36(suppl_2), W163-W169. 2008.

RAYMOND, M. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity.** v. 86, p. 248-249, 1995.

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.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. **Nature Biotechnology,** v. 18, p. 233-234, 2000.

TRINGALI, M. D.; BERT, T. M. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis).* **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53, n. 5, p. 974-984, 1996.

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.

WILSON JR, R. R. et al. Mitochondrial DNA control region of common snook and its prospect for use as a genetic tag. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 4, p. 594-606, 1997.

YOU, F. M. et al. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. **BMC bioinformatics**, v.9, n.1, p.253, 2008.

ZANE, L. et al. T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA INTER E INTRAPOPULACIONAL DA ESPÉCIE *Centropomus parallelus* AO LONGO DE ESTUÁRIOS DAS REGIÃO SUL E SUDESTE DO BRASIL: DA BANCADA AO MANEJO SUSTENTADO.

Letícia Rafaela de Morais[1]; Danilo Assunção Vitoriano[1]; Caio Augusto Perazza[1]; Domingos Garrone Neto[2]; Acácio Tomás[3], Alexandre Wagner Silva Hilsdorf[1]

[1]Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

[2]UNESP, Registro, SP, Brasil.

[3]Instituto de Pesca, Santos, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

wagner@umc.br, +55 11 4798-7210

RESUMO

A pesca recreativa tem crescido para muitos exemplares de peixes marinhos e estuarinos e gerado importantes retornos sociais e econômicos no Brasil, dentre essas espécies o robalo-peva (*Centropomus parallelus*) tem sido a principal espécie alvo na região sudeste, subsidiando tanto a pesca artesanal como o setor de pesca esportiva. No Brasil trabalhos voltados para essa espécie têm sido realizados a fim de compreender os efeitos da prática de pesque e solte, padrões migratórios e sua biologia reprodutiva, porém estudos voltados para genética de populações ainda são escassos. O uso de marcadores genéticos, principalmente os microssatélites, tem sido amplamente utilizado para avaliar a variabilidade genética de populações. Face ao exposto, os objetivos do presente trabalho foram: (i) descrever os padrões de diversidade genética inter e intrapopulacional de *C. parallelus* por marcadores microssatélites; (ii) testar a hipótese nula de panmixia nos estuários do sul e sudeste do Brasil; (iii) testar a hipótese de migração latitudinal no complexo estuarino Cananéia-Iguape. Para avaliação da dinâmica populacional dessas localidades, o trabalho contou com amostras do Sul e Sudeste do Brasil, avaliadas com 15 *loci* microssatélites, desenvolvidos para a espécie *C. parallelus.* Após a extração do DNA e amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase- PCR, cada indivíduo amostrado foi genotipado com o equipamento Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) para posterior análise estatística. De acordo com os resultados, foi possível observar indicativos de estruturação genética nas localidades amostradas, inclusive os índices de diferenciação genética Dest foram de moderado a alto, exceto entre a população de Torres e Florianópolis que apresentaram índice de 0,01 indicando alto fluxo gênico. Além disso, os resultados ressaltam a importância de estudos com marcação centrados na compreensão do ciclo de vida da espécie e do seu comportamento migratório. Esse primeiro estudo genético populacional da espécie *C. parallelus* ao longo de um gradiente de estuários da costa sul e sudeste do Brasil de uma espécie hermafrodita sequenciais protândricas poderá servir de base para o desenvolvimento de um plano de gestão, manejo e conservação das populações estudadas de forma a garantir a conservação e sustentabilidade deste recurso genético à médio e longo prazos em unidades de manejo distintas.

Palavras-chave: espécies estuarinas, ictiogenética, recursos pesqueiros, Centropomidae.

ABSTRACT

Recreational fishing has grown for many marines and estuarine fish species and generated significant social and economic returns in Brazil. The sea bass (*Centropomus parallelus*) has been the main target species in the southeast region, subsidizing artisanal and sport fishing. In Brazil, studies on this species have been carried out to assess the effects of the practice of catch-and-release, migratory patterns, and its reproductive biology. However, studies on population genetics are still scarce. Genetic markers, especially microsatellites, have been widely used to evaluate the genetic variability of populations. Against this background, the objectives of this study were: (i) to describe the patterns of inter- and intrapopulation genetic diversity of *C. parallelus* using microsatellite markers; (ii) to test the null hypothesis of panmixia in the estuaries of southern and southeastern Brazil; (iii) to test the hypothesis of latitudinal migration in the Cananéia-Iguape estuarine complex. This study used South and Southeast Brazil samples to assess the genetic population dynamics of estuarine samples with 15 microsatellite *loci* developed for the species *C. parallelus*. After DNA extraction and amplification by polymerase chain reaction (PCR), each sampled individual was genotyped with the Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) for further statistical analysis. According to the results, it was possible to observe indications of genetic structure in the sampled localities. Furthermore, the results highlight the importance of tagging studies focused on understanding the species' life cycle and its migratory behavior. This first population genetic study of *C. parallelus* along a gradient of estuaries of the south and southeast coast of Brazil of a protandric sequential hermaphrodite species may serve as a basis for developing a management plan, management and conservation of populations studied to ensure the conservation and sustainability of this genetic resource in the medium and long term as different management units.

Keywords: estuarine species, ichthyogenetics, fishery resources, Centropomidae.

3. INTRODUÇÃO

Apesar do oceano ser imenso, os recursos oceânicos não são ilimitados e estão sob intensa pressão para atender a demanda devido ao crescimento populacional em expansão e à globalização, de modo que populações de peixes estão entrando em declínio estimulados pela crescente procura mundial de produtos advindos da pesca (*NATIONAL RESEARCH COUNCIL*, 2009). A pesca têm sido um dos maiores fatores de modificação dos ecossistemas marinhos, seus efeitos sinérgicos, a variação ambiental e as alterações climáticas ameaçam cada vez mais esses ecossistemas dificultando sua gestão e impulsionado, a longo prazo, a redução de muitas unidades populacionais de peixes (CROWDER *et al.*, 2008; WORM *et al*., 2009; YAN *et al.*, 2020).

Por consequência populações pequenas e isoladas de espécies-alvo da pesca podem perder diversidade devido à deriva genética e resultar no esgotamento demográfico de subpopulações localmente adaptadas (HOFFMANN; WILLI, 2008). Compreender os padrões geográficos de variação genética para peixes marinhos economicamente importantes é fundamental para determinar a estrutura da população, barreiras de migração, padrões de recrutamento e outros componentes biológicos necessários para gerir a exploração dessas populações em um contexto espacial (HELLBERG *et al*., 2002, GLASS *et al.,* 2021).

A gestão de recursos pesqueiros comerciais geralmente é feita partindo-se do pressuposto que as populações são espacialmente homogêneas em toda a sua área geográfica. No entanto, um fluxo genético desigual pode resultar em gradientes de diversidade genética em organismos aquáticos que podem afetar a dinâmica populacional e os pontos de referência de gestão, podendo contribuir para a sobrepesca (CISNEROS-MATA *et al.*, 2019). Essas mudanças podem alterar rapidamente as frequências alélicas em populações de espécies com intervalo de geração relativamente curto, entretanto tais alterações podem ser detectáveis utilizando marcadores genéticos neutros (HOFFMANN; WILLI, 2008).

O uso de marcadores genéticos tem sido utilizado desde a década de 1970 demonstrando a variabilidade dentro e entre populações possibilitando a compreensão dos processos que levam algumas espécies ao isolamento e adaptação em populações locais (HILSDORF; HALLERMAN, 2017). Entre esses marcadores podemos citar os microssatélites, conhecido também como STR ou SSR ("*Short Tandem Repeats*" ou *Simple Sequence Repeats*) se tornou um dos marcadores moleculares mais populares em vários estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e relativa facilidade de obtenção, além disso possui alta reprodutibilidade, baixo

custo para desenvolvimento e facilidade na obtenção, principalmente por meio de *Next-Generation Sequencing* (FERGUSON *et al*., 1995; ZANE *et al*., 2002; KUMAR; KOCOUR, 2017).

Os microssatélites são marcadores moleculares codominantes, compostos por sequencias nucleotídicas curtas repetidas "em fila" ou em *tandem*, os quais são chamados de motivo (ou "*motifs*") que se distribuem amplamente pelo genoma e demonstram elevados níveis de polimorfismo, tamanho relativamente pequeno e protocolos de detecção rápida (ZANE, 2002; SELKOE; TONEEM, 2006; FERGUSON *et al*., 1995). Além disso, esses marcadores possuem herança mendeliana, portanto podem ser utilizados em análises de genética populacional, elaboração de mapas genéticos mais sofisticados e testes de polimorfismo de DNA, sua utilização em organismos com genomas complexos tornou possível o mapeamento, manipulação e clonagem de genes associados a caracteres de interesse biológico (DEFAVERI *et al.*, 2013; ABDUL-MUNEER, 2014)

Além de sua extensa aplicabilidade, estes marcadores são popularmente usados na pesca e na aquicultura para caracterização de estoques genéticos, seleção de reprodutores, construção de mapas de ligação, mapeamento de traços quantitativos economicamente importantes e identificação de genes responsáveis por estas características, aplicação em programas de criação assistida por marcadores e em estudos com genética de populações (CHISTIAKOV, 2006). A preservação dos recursos genéticos tornou-se um importante elemento para conservação, objetivando compreender a importância de conservar a variação genética a nível tanto de espécies como de populações dentro das espécies, inclusive os efeitos que as práticas de pesca têm sobre essa diversidade genética (KENCHINGTON, 2003).

A pesca recreativa tem crescido para muitos exemplares de peixes marinhos e estuarinos e gerado importantes retornos sociais e econômicos no Brasil, o robalo-peva é a principal espécie alvo na região sudeste subsidiando um grande setor da pesca inclusive torneios recreativos (LENNOX *et al*, 2015). De acordo com Machado (2011), no Brasil, as espécies que possuem maior importância econômica quando encontrada em seu habitat natural são o robalo-peva, *C. parallelus*, e robalo-flecha, *C. undecimalis*, esses peixes residem em ambientes estuarinos, lagunas e na costa marinha ao longo das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, onde os juvenis se abrigam e se alimentam, entram nos rios adaptando-se facilmente a águas salobras e doces e ocasionalmente penetram em lagoas hipersalinas (MENDONÇA, 2004).

No Brasil alguns trabalhos voltados para a espécie *C. parallelus* têm sido realizados a fim de compreender os efeitos da prática de pesque e solte, entender os padrões migratórios dessa espécie em regiões estuarinas e sua biologia reprodutiva (LENNOX *et al.*, 2015; DAROS

et al., 2016; ASSIS *et al.*, 2019), porém estudos voltados para genética de populações ainda são escassos.

Face ao exposto, os objetivos deste estudo foram: (i) descrever os padrões de diversidade genética inter e intrapopulacional de *C. parallelus* por marcadores microssatélites espécie específicos; (ii) testar a hipótese nula de panmixia nos estuários do sul e sudeste do Brasil; (iii) testar a hipótese de migração latitudinal no complexo estuarino Cananéia- Iguape.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem contou com a colaboração dos pesquisadores e pescadores esportivos participantes da Rede Robalos do Brasil, liderada pelo Projeto Robalo da UNESP de Registro, os experimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) na Universidade Mogi das Cruzes- UMC.

3.2.1 Locais de coleta

O total de amostras utilizados no presente trabalho foi de 362 (Tabela 3), a coleta de tecido foi feita utilizando-se métodos não invasivos, com a retirada de um pedaço de aproximadamente 1 cm da nadadeira caudal, ocorrendo por meio de pesca esportiva, com os pesquisadores acompanhando pescadores, especialmente durante competições do gênero nas regiões estuarinas situadas entre os estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Figura 6).

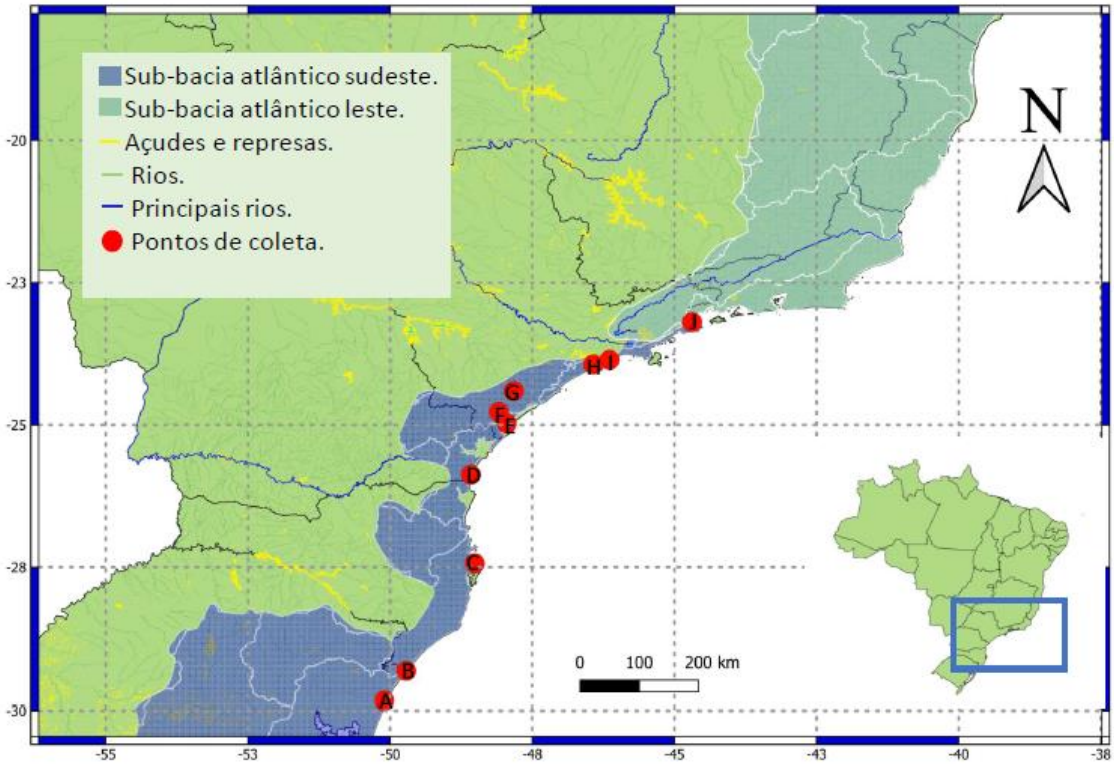
Essa estratégia já tem sido utilizada por pesquisadores da Rede Robalos do Brasil, que acompanham competições de pesca esportiva no Sul e no Sudeste do Brasil, visando a obtenção de dados morfométricos e avaliações sobre os efeitos do pesque-solte, essa colaboração permitiu o acesso ao elevado número de amostras biológicas, sem a necessidade do abate de animais.

O material biológico foi mantido em etanol 95% e, posteriormente, levado para o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) na Universidade Mogi das Cruzes – UMC, onde as análises moleculares foram realizadas.

Tabela 3 - Amostragens realizadas durante o primeiro ano do projeto.

Estado	Local	Característica	Coordenadas geográficas	N	Data
RJ	Paraty	Estuário	23°11'39.45"S 44°41'27.80"W	23	dez/19
SP	Cubatão	Estuário/torneio	23°56'10.0"S 46°25'50.5"W	35	abr/20
SP	Bertioga	Estuário/torneio	23°51'19.4"S 46°08'26.9"W	45	nov/19
SP	Cananéia	Estuário/torneio	24°58'40.9"S 47°56'49.7"W	71	set/19, jan/20
SP	Registro	Rio Ribeira	24°24'15.61"S 47°49'32.57"W	56	out, dez/2018 e jan, ago, out/19
SP	Rio Guaraú	Rio	24°46'14.41"S 48°05'22.23"W	13	nov/2018, ago, set/2020
PR	Guaratuba	Estuário	25.87´39.5"S 48.579478"W	60	abr/19
SC	Florianópolis	Estuário	27°26'05.5"S 48°30'30.9"W	36	nov/19 - jan/20
RS	Passo de Torres	Rio Mampituba	29º19´43.0´´S 48º43´38.9´´W	17	jun/20
RS	Rio Tramandaí	Rio Tramandaí	29º50´05.8"S 50º06´05.0´´W	23	jun/20
			Total de amostras:	362	

Figura 6 - Área de estudo, com a indicação dos oito pontos de coleta de amostras, sendo A: Tramandaí- RS; B: Torres- RS; C- Florianópolis- SC; D: Guaratuba- PR; E: Cananéia- SP; F: Guaraú- SP; G: Registro- SP; H: Cubatão- SP; I: Bertioga- SP, J: Paraty- RJ.



Fonte: Qgis Development Team, 2021

3.2.2 Extração de DNA e purificação

O DNA foi extraído da nadadeira caudal, seguindo o protocolo de Extração Salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). A verificação da qualidade e da integridade do DNA foi feita por meio de gel de agarose a 1,0 % em eletroforese horizontal, utilizando-se marcadores de peso molecular (Lambda DNA/HindIII-Fermentas, O'Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus-Fermentas e *Low* DNA *Mass Ladder-Invitrogen*). Fatores como pureza (260nm/280nm) e concentração (em ng/µL) do material extraído foram verificados por densidade óptica em espectrofotômetro (NANOVUE DNA da GE Healthcare®).

3.2.3 Amplificação por PCR

Todos os microssatélites desenvolvidos no Capítulo 1 foram utilizados para amplificação por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para um volume final de 25µL contendo: 20ng/ µL de DNA, 2,0 µL de solução tampão com cloreto de potássio

KCl, 2,0 μL de dNTP à 10mM, 10mM de cada iniciador, em relação às concentrações de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) alguns testes foram feitos variando entre 1,5; 2,0 e 2,5 mM. As condições de amplificação foram utilizadas no termociclador variando a temperatura de anelamento de 54ºC a 58ºC (Tabela 4), de acordo com o painel proposto.

Tabela 4 - Condições de amplificação utilizadas no termociclador.

Etapas	Temperatura (ºC)	Tempo (seg)
Desnaturação inicial	95	180
Desnaturação	94	30
Anelamento	De 54 a 56	60
Extensão	72	60
Extensão final	72	420

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, e em seguida visualizados para a verificação da qualidade das bandas no fotodocumentador ImageQuant ™ 300 Imager (GE HealthcareLife), utilizando o marcador de 50pb DNA Ladder-Sinapse). Após a amplificação dos 15 *loci* em toda amostragem coletada foi feita a genotipagem das amostras.

3.2.4 Genotipagem

Os produtos de PCR foram genotipados, usando uma matriz de gel de poliacrilamida desnaturada 6,5% (KB plus 6,5% Gel Matrix, Li-Cor, Biosciences, Lincoln, NE, USA), em seguida analisadas no sequenciador semiautomático DNA Analyzer 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, NE, USA), utilizando o marcador IRDye®700 e iniciador cauda M13 universal descrito por Schuelke (2000). O tamanho dos alelos foi estimado pela interpolação da posição destes com os marcadores de peso molecular (50–350 bp DNA Sizing Standard IRDye®700), utilizando o programa SagaGT Client (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA). A marcação independente de alelos por analistas diferentes foi empregada, assim como o uso de amostras controle para reduzir o erro de genotipagem

3.2.5 Análises estatísticas

No pacote diveRsity do programa R (KEENAN *et al*., 2013), foram analisados os seguintes parâmetros: número de alelos por *locus* (A), número de alelos exclusivos, índice de fixação (FIS), heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He). Para determinar a estruturação populacional por meio da análise discriminante por meio de componentes principais (Discriminant analysis of principal components - DAPC) foi utilizado o pacote adegenet .do programa R (JOMBART, 2008; JOMBART *et al*., 2010)

A avaliação da endogamia dos animais amostrados foi realizada por simulações e estimativas de parentesco médio pelo programa Coancestry versão 1.0.1.5. (WANG, 2011). Nesta avaliação testou-se sete estimadores pontuais de parentesco rxy (EPP): (TrioML, Wang, LynchLi, LynchRd, Ritland, QuellerGt e DyadML).

O tamanho efetivo populacional (Ne) de cada localidade amostrada foi estimado e comparado com base no método de desequilíbrio de ligação (WAPLES; DO 2010), usando o programa NeEstimator 2.0 (Do *et al.*, 2014) utilizando o valor crítico de alelo raro de 0,05. Os gráficos foram construídos com auxílio do pacote ggplot2 do software R (WICKHAM, 2016).

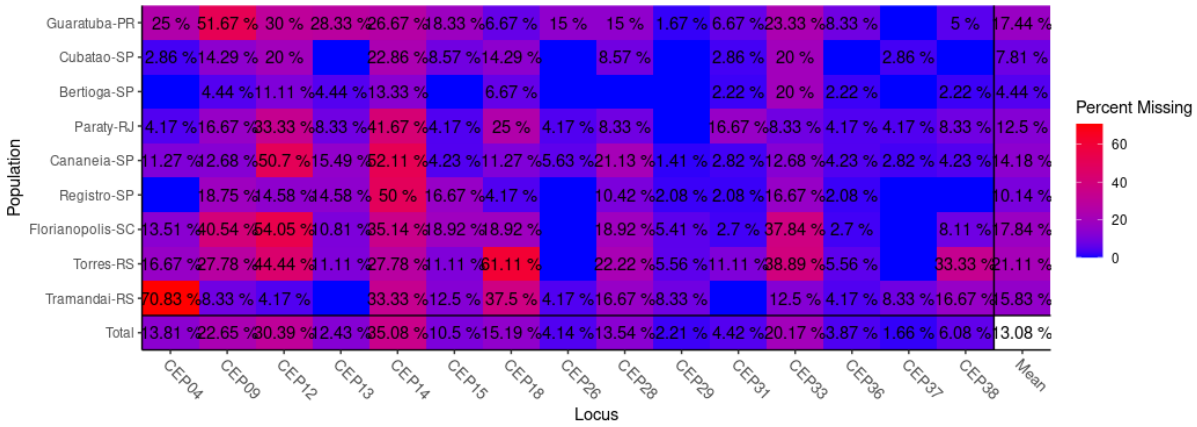
3.3 RESULTADOS

O painel de *loci* STR desenvolvido neste trabalho (Capítulo 1) foi testado em 362 animais da espécie *C. parallelus*, oriundos de diferentes estuários coletado nos estados de Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os 15 lócus polimórficos desenvolvidos foram utilizados com intuito de avaliar a estruturação genética dessas populações.

3.3.1 Análise e filtragem do banco de dados

Ao iniciar as análises estatísticas o banco de dados apresentava uma média de 17% de dados perdidos, foi feita a filtragem e remoção das amostras reduzindo a quantidade de dados perdidos para 13,08% (Figura 7). Análises realizadas com grande porcentagem de dados perdidos impactam negativamente estudos populacionais até mais que erros causados por genotipagem (REEVES *et al.*, 2016).

Figura 7 - Gráfico de calor gerado pelo pacote popopr com o percentual de dados perdidos



Além da remoção de animais com excesso de dados perdidos, para garantir a robustez e confiabilidade nos resultados obtidos, foi realizada uma análise de parentesco objetivando retirar os indivíduos com valores de coeficiente mais altos, pois segundo REEVES (2016) esses indivíduos aparentados podem tendenciar as frequências alélicas dos *loci* microssatélites. Os estimadores pontuais de parentesco (EPP) por meio de marcadores codominantes determinam a relação entre indivíduos são, estes são: TrioML, Wang, LynchLi, LynchRd, Ritland, QuellerGt e DyadML. As variâncias de amostragem dos EPPs variaram de 0,01209 a 0,04437 (Tabela 5), sendo a menor variância encontrada no estimador de verossimilhança triádica (TrioML).

Tabela 5 - Média e variância dos estimadores pontuais de parentesco.

n=65341	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Média	0,0882	-0,08348	-0,07844	-0,00369	-0,00431	-0,00318	0,08283
Variância	0,00945	0,01645	0,02829	0,00861	0,0152	0,02174	0,00915

A correlação entre os índices de LynchLi e QuellerGt foram altas (0,9365) e as que tiveram a menor correlação foram Wang e Ritland (0,6217). As altas correlações entre os EPP indicam que independentemente do método escolhido as estimativas serão semelhantes e acuradas (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre os Estimadores Pontuais de Parentesco (EPP).

Correlação	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1,0000						
Wang	0,7504	1,0000					
LynchLi	0,7236	0,8784	1,0000				
LynchRd	0,7612	0,8007	0,7127	1,0000			
Ritland	0,6688	0,6217	0,7063	0,7903	1,0000		
QuellerGt	0,7586	0,8188	0,9365	0,7453	0,7560	1,0000	
DyadML	0,9264	0,7812	0,7600	0,8043	0,6990	0,8066	1,0000

3.3.2 Diversidade genética intrapopulacional

Os 15 *lócus* polimórficos desenvolvidos foram utilizados para caracterizar cada ponto amostral, na Tabela 7, é apresentada a estatística descritiva por população e *loci* analisados. A média de alelos por *locus* variou de 6,13 (Torres) à 11,333 (Cananéia). A média do Fis foi de 0,37 em Guaratuba a 0,25 em Florianópolis. Os valores de riqueza alélica (AR) variaram de 5,13 em Torres à 6,69 em Cubatão.

Em relação aos alelos privativos (Tabela 8), a população de Cananéia foi que apresentou maior número de alelos privativos totalizando 21, já o menor número desses alelos foi encontrado em Torres e Paraty, ambos apenas com 2. No entanto o maior número de repetição de alelos privativos foi encontrado em Bertioga, os alelos 152 e 164 pertencentes ao lócus CEP14 apareceu 10 vezes cada nessa população.

Tabela 7 - Estatística descritiva (N – número de indivíduos; A – número de alelos; Ar – riqueza alélica; Ho – heterozigosidade observada; He - heterozigosidade esperada e Fis.).

Estuário		*Loci*															
		CEP04	**CEP09**	**CEP12**	**CEP13**	**CEP14**	**CEP15**	**CEP18**	**CEP26**	**CEP28**	**CEP29**	**CEP31**	**CEP33**	**CEP36**	**CEP37**	**CEP38**	**Média**
Guaratuba - PR	**N**	45	29	42	43	44	49	56	51	51	59	56	46	55	60	57	49.53
	A	17	12	10	11	8	15	17	8	9	5	7	14	4	7	5	9.93
	Ar	9.53	7.43	6.34	7.73	5.72	10.55	11.81	5.18	7.41	4.17	5.48	9.35	2.72	4.99	3.86	6.82
	Ho	0.56	0.45	0.57	0.53	0.36	0.69	0.57	0.29	0.67	0.29	0.52	0.37	0.45	0.4	0.37	0.47
	He	0.85	0.89	0.79	0.87	0.77	0.9	0.91	0.73	0.84	0.67	0.64	0.89	0.5	0.41	0.62	0.75
	HWE	0	0	0	1,00E-04	0	0.001	0	0	0	0	0.0328	0	0.4766	0.5232	1,00E-04	0
	Fis	0.3465	0.4983	0.2792	0.383	0.5304	0.233	0.3712	0.5955	0.2044	0.567	0.19	0.5848	0.0921	0.0296	0.406	0.3709
Cubatão - SP	**N**	34	30	28	35	27	32	30	35	32	35	34	28	35	34	35	32.27
	A	18	10	14	10	11	11	14	6	10	4	9	13	3	6	5	9.6
	Ar	11.52	7.78	8.36	7.96	7.52	8.58	10.01	5.2	7.58	3.81	6.35	8.94	2.67	4.55	4.05	6.99
	Ho	0.59	0.4	0.79	0.51	0.48	0.66	0.6	0.54	0.66	0.29	0.62	0.29	0.49	0.5	0.46	0.52
	He	0.87	0.83	0.8	0.82	0.84	0.85	0.88	0.75	0.82	0.69	0.68	0.9	0.44	0.49	0.61	0.75
	HWE	0.0091	0	0	1,00E-04	0	0.3898	0.0013	0.0684	0.2611	0	0.9466	0	0.0889	0.8166	0.0867	0
	Fis	0.321	0.5206	0.0128	0.3716	0.4255	0.2298	0.3195	0.2752	0.1976	0.5836	0.0979	0.6816	-0.1153	-0.0158	0.2483	0.3021
Bertioga - SP	**N**	45	43	40	43	39	45	42	45	45	45	44	36	44	45	44	43
	A	18	10	10	6	10	10	17	6	9	5	7	19	3	6	4	9.33
	Ar	12.76	7.26	6.74	4.49	7.54	7.6	9.82	4.69	7.97	4.71	4.81	11.4	2.97	4.18	3.14	6.67
	Ho	0.67	0.58	0.55	0.4	0.26	0.53	0.38	0.58	0.67	0.84	0.57	0.39	0.52	0.29	0.48	0.51
	He	0.91	0.81	0.76	0.71	0.86	0.83	0.82	0.63	0.84	0.76	0.6	0.92	0.58	0.44	0.55	0.73
	HWE	0	2,00E-04	0	0	0	0	0	0.8178	0.2044	0.0196	0.9662	0	0.0135	0	0.294	0
	Fis	0.2635	0.2778	0.2766	0.4464	0.7014	0.3573	0.5364	0.0758	0.2073	-0.1169	0.0542	0.5795	0.096	0.3431	0.132	0.3008

Paraty- RJ	**N**	23	20	16	22	14	23	18	23	22	24	20	22	23	23	22	21
	A	15	13	10	4	7	8	12	4	10	4	5	16	3	6	4	8.06
	Ar	11.57	9.88	7.13	3.61	5.58	5.94	9.13	3.6	7.81	3.93	3.97	12.32	2.99	4.88	3.79	6.41
	Ho	0.57	0.45	0.5	0.32	0.79	0.43	0.67	0.52	0.27	0.38	0.5	0.82	0.48	0.39	0.55	0.51
	He	0.91	0.89	0.77	0.61	0.82	0.75	0.88	0.55	0.83	0.64	0.57	0.91	0.58	0.68	0.68	0.74
	HWE	0.0168	0	1,00E-04	9,00E-04	0	0.0133	0.08	0.5894	0	0.0548	0.6269	0.0181	0.0155	0.0477	0.0049	0
	Fis	0.3771	0.4937	0.3535	0.4815	0.0375	0.4199	0.2434	0.0433	0.6712	0.4154	0.117	0.101	0.1746	0.4282	0.2	0.3113
Cananéia - SP	**N**	63	62	35	60	34	68	63	67	56	70	69	62	68	69	68	60.93
	A	16	19	20	8	9	13	16	7	12	5	9	20	4	7	5	11.33
	Ar	10.65	12.27	8.1	4.6	5	9.05	10.3	4.78	7.79	4.13	5.6	12.65	3.29	4.72	4.2	7.14
	Ho	0.52	0.61	0.57	0.48	0.24	0.46	0.63	0.54	0.68	0.14	0.48	0.68	0.37	0.41	0.43	0.48
	He	0.9	0.92	0.88	0.67	0.77	0.86	0.89	0.65	0.85	0.63	0.67	0.93	0.58	0.41	0.64	0.75
	HWE	0	0	0	0.013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0
	Fis	0.418	0.3361	0.3519	0.2773	0.6942	0.4722	0.2883	0.1796	0.2037	0.7718	0.2862	0.2698	0.3661	8,00E-04	0.3302	0.3573
Ribeira - SP	**N**	48	39	41	41	24	40	46	48	43	47	47	40	47	48	48	43.13
	A	16	13	7	6	7	7	14	7	12	5	9	15	3	5	7	8.86
	Ar	11.33	9.85	6.07	4.54	5.26	5.95	10.42	5.82	9.44	3.63	5.74	10.9	2.55	3.6	5.12	6.68
	Ho	0.62	0.44	0.56	0.34	0.67	0.38	0.61	0.5	0.63	0.17	0.49	0.52	0.23	0.35	0.54	0.47
	He	0.9	0.91	0.76	0.73	0.77	0.8	0.89	0.74	0.88	0.63	0.63	0.91	0.42	0.38	0.71	0.74
	HWE	0.011	0	0.0228	0	0	0	0	0.0019	0.0012	0	0	0	0.006	0.9986	0	0
	Fis	0.3025	0.5211	0.2616	0.5354	0.1361	0.529	0.3165	0.3235	0.2886	0.7287	0.2192	0.4223	0.4438	0.0774	0.2388	0.362
Florianópolis - SC	**N**	32	22	17	33	24	30	30	37	30	35	36	23	36	37	34	30.4
	A	17	12	9	6	7	13	14	9	8	6	6	14	3	3	4	8.73
	Ar	10.64	7.42	5.96	4.77	4.25	9.2	10.22	7.63	7.24	5.22	4.76	9.64	2.63	2.86	3.35	6.39
	Ho	0.69	0.41	0.82	0.52	0.12	0.67	0.7	0.62	0.6	0.66	0.47	0.65	0.47	0.3	0.41	0.54

	He	0.87	0.83	0.78	0.74	0.59	0.86	0.89	0.8	0.85	0.76	0.62	0.91	0.44	0.34	0.59	0.720
	HWE	0.0055	0	0	0.0883	0	0.0332	0	0.0359	0.0835	0.146	0	7,00E-04	0.8471	0.3932	0.2122	0
	Fis	0.2068	0.5068	-0.0554	0.3014	0.7898	0.2238	0.2174	0.2267	0.2904	0.1335	0.2388	0.2805	-0.0737	0.1238	0.3056	0.2537
Torres - RS	**N**	15	13	10	16	13	16	7	18	14	17	16	11	17	18	12	14.2
	A	12	10	5	4	6	7	9	7	8	4	6	4	3	3	4	6.13
	Ar	9.54	7.89	4.5	3.88	5.02	6.32	6.25	5.84	6.92	3.64	4.81	3.6	2.64	2.49	3.6	5.13
	Ho	0.67	0.54	0.3	0.56	0.31	0.19	0.57	0.5	0.64	0.65	0.56	0.09	0.47	0.17	0.67	0.46
	He	0.88	0.85	0.76	0.7	0.65	0.82	0.88	0.71	0.84	0.68	0.66	0.69	0.48	0.16	0.55	0.69
	HWE	0.1441	9,00E-04	0	0.7091	0.0202	0	0.0179	0.1337	0.5253	0.8323	0.7618	0.0011	0.9055	0.9852	0.4088	0
	Fis	0.2424	0.3659	0.6078	0.1933	0.5273	0.7709	0.3488	0.2957	0.234	0.0483	0.1454	0.8683	0.0109	-0.0693	-0.2152	0.3316
Tramandaí - RS	**N**	7	22	23	24	16	21	15	23	20	22	24	21	23	22	20	20.2
	A	8	11	8	6	9	9	13	7	5	4	6	10	2	3	5	7.06
	Ar	5.27	9.01	6.9	5.26	6.63	7.47	8.85	6.03	4.89	3.68	4.94	8.21	2	2.77	4.86	5.78
	Ho	0.71	0.64	0.39	0.46	0.12	0.33	0.53	0.57	0.7	0.55	0.5	0.57	0.3	0.32	0.55	0.48
	He	0.83	0.88	0.82	0.75	0.87	0.84	0.87	0.76	0.76	0.61	0.67	0.87	0.44	0.34	0.72	0.74
	HWE	0.7061	1,00E-04	0	0.0195	0	0	0.0023	0.2604	1,00E-04	0.3584	0.16	0.0339	0.1398	0.8303	0	0
	Fis	0.1358	0.2753	0.5247	0.386	0.8565	0.6032	0.3893	0.2525	0.085	0.1096	0.2558	0.342	0.3075	0.0638	0.2348	0.3431

Tabela 8 - Identificação do *locus* seguido do alelo privativo separados por população e entre parênteses o número de repetições em que apareceram

Guaratuba-PR	**Cubatão-SP**	**Bertioga-SP**	**Paraty-RJ**	**Cananéia-SP**	**Registro-SP**	**Florianópolis-SC**	**Torres-RS**	**Tramandaí-RS**
CEP04.266	CEP04.186	CEP04.236	CEP15.178	CEP09.205	CEP18.212	CEP12.145 (6)	CEP29.176	CEP38.219 (3)
CEP13.147	CEP04.172	CEP04.238 (3)	CEP33.112	CEP09.161 (4)	CEP28.181 (3)	CEP18.210 (2)	CEP09.157(3)	CEP14.178 (4)
CEP13.195 (2)	CEP12.147 (2)	CEP04.242		CEP12.168 (3)	CEP31.153 (2)	CEP26.174 (2)		CEP09.199
CEP14.210	CEP12.193	CEP09.201		CEP12.176 (2)	CEP38.179 (2)	CEP29.185		CEP31.157
CEP26.138	CEP13.185	CEP12.197		CEP12.210	CEP38.195 (2)			
	CEP14.202 (2)	CEP14.152(10)		CEP12.212	CEP31.153 (2)			
	CEP14.132	CEP14.148 (6)		CEP12.162	CEP38.179 (2)			
		CEP14.164 (10)		CEP12.170	CEP38.195 (2)			
		CEP14.150 (2)		CEP12.198				
		CEP14.168		CEP12.202				
		CEP18.208 (5)		CEP12.184				
		CEP37.179		CEP12.194				
				CEP12.206				
				CEP12.192				
				CEP13.131				
				CEP14.198 (5)				
				CEP18.162				
				CEP28.178				
				CEP31.197				
				CEP31.209 (2)				
				CEP33.128				

Tabela 9 - Análise par a par de parentesco entre as populações amostradas

	Guaratuba	**Cubatão**	**Bertioga**	**Paraty**	**Cananéia**	**Registro**	**Florianópolis**	**Torres**	**Tramandaí**
Guaratuba	0,15	0,12	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07
Cubatão		0,15	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Bertioga			0,19	0,13	0,07	0,05	0,07	0,07	0,09
Paraty				0,15	0,12	0,06	0,06	0,06	0,08
Cananéia					0,14	0,07	0,06	0,07	0,06
Registro						0,15	0,09	0,09	0,08
Florianópolis							0,16	0,17	0,09
Torres								0,19	0,12
Tramandaí									0,17

De acordo com a Tabela 9 é possível observar o parentesco entre as populações a qual foi construída de acordo com os resultados obtidos por meio do EPP TrioMl, o índice varia de 0 a 1 onde o valor máximo representa maior nível de parentesco. Esses resultados corroboram os índices de diferenciação Dest observado em Torres e Florianópolis por exemplo, cujo apresentou o maior índice de parentesco foi 0,17, já o menor índice de parentesco observado foi de 0,05 entre as populações de Guaratuba e Bertioga e Registro e Bertioga.

O Número efetivo populacional (Ne) (Tabela 10) foi estimado utilizando o método de desequilíbrio de ligação. O desequilíbrio de ligação pode ser definido como associações não aleatórias entre alelos em *loci* diferentes dentro de uma determinada população, apresentando grande importância na estimação de parâmetros populacionais (TENESA *et al.*, 2007).

Esse desequilíbrio ocorre exclusivamente da deriva *genética* para *locus* neutro desvinculado em população isolada com acasalamento ao acaso, portanto pode ser utilizado para estimar o tamanho efetivo (Ne) da população explorando sua variação ou a correlação das frequências entre *locus* (HILL, 1981). As populações de Guaratuba, Tramandaí e Torres o valor foi estatisticamente infinito, para as demais localidades os índices variaram de 21,4 em Paraty a 469,9 em Registro.

Tabela 10 - Número efetivo populacional (Ne) por localidade

Localidade	**Estimated Ne^ 0,05**	**95% CIs for *Ne***
Guaratuba	Infinito	262.9- Infinito
Cubatão	96.1	53.4- 336.5
Bertioga	277.6	118.8- Infinito
Paraty	51.4	29.1- 155
Cananéia	239.7	127.8- 1175.8
Registro	469.9	149- Infinito
Florianópolis	326.9	84.7- Infinito
Torres	Infinito	272.3- Infinito
Tramandaí	Infinito	100.8- Infinito

Número efetivo populacional (N_e), CI= interval de confiança. Estimativa via *Linkage disequilibrium method.*

3.3.3 Avaliação da diversidade genética interpopulacional na região Sul e Sudeste da costa do Brasil

Para a análise discriminante por meio de componentes principais (*Discriminant Analysis of Principal Components* - DAPC) foram encontradas trinta e três componentes principais (Figura 9-C), posteriormente é possível observar que as populações formaram nove agrupamentos genéticos (Figura 9- A). As populações oriundas de Cubatão- SP e Guaratuba- PR se diferem, em sua maioria das demais, Bertioga, Cananéia e Registro e, também, formam agrupamentos distintos e únicos. Já a região Sul composta por Florianópolis, Torres e Tramandaí apesar de estarem em agrupamentos diferentes há uma certa homogeneidade entre eles principalmente entre Torres e Florianópolis.

Estes resultados podem ser mais bem visualizados numa disposição gráfica em *ScatterPlot* (Figura 9- B), nos quais os indivíduos são representados por figuras geométricas e cores diferentes. Nesta figura ficam caracterizadas a separação em nove populações, sendo estas: 1 Guaratuba- PR (GUA); 2 Cubatão- SP (CUB); 3 Bertioga-SP (BER); 4 Paraty- RJ (PTY); Cananéia- SP (CAN); 6 Ribeira- SP (RIB); 7 Florianópolis- SC (FLO); 8 Torres- RS (TOR) e 9 Tramandaí- RS (TRA).

De acordo com a Figura 8 é possível observar mediana de cada população, quanto maior o n e a dispersão dos dados maior é a caixa observada, em contrapartida quanto mais próximo da mediana menor será a caixa, portanto podemos concluir que a endogamia das populações é semelhante.

Figura 8 - Gráfico boxplot de endogamia das populações observadas

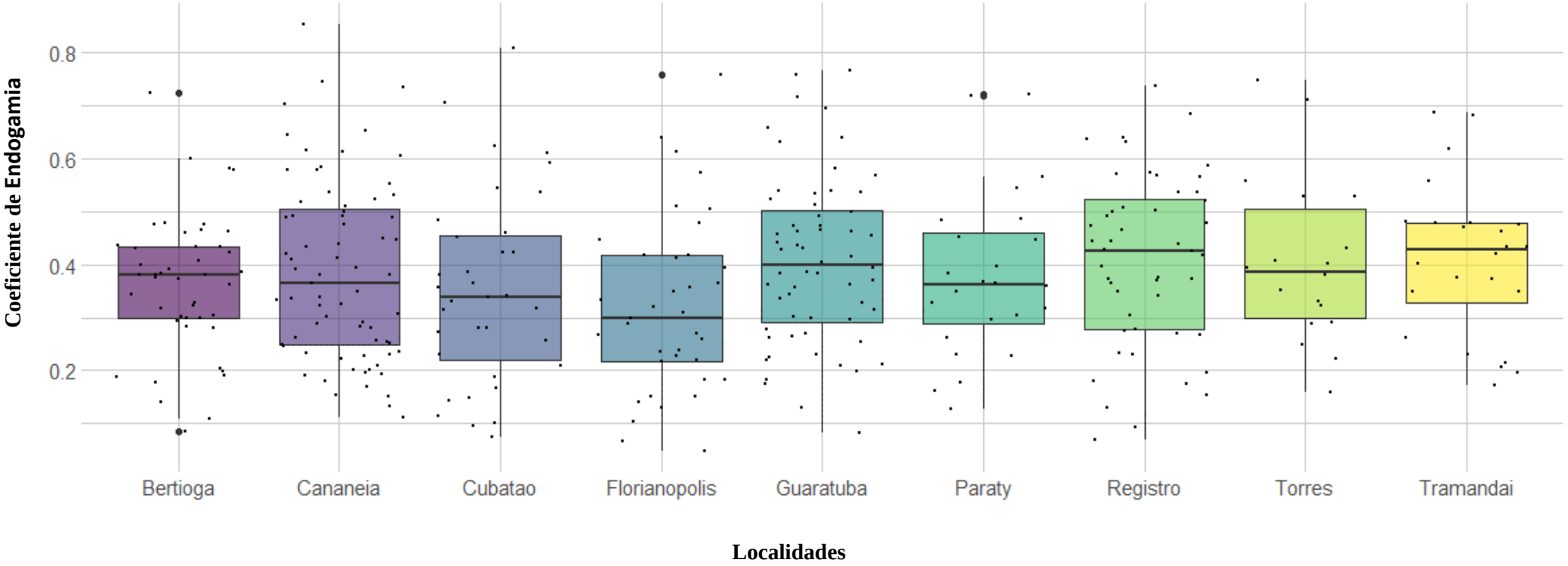
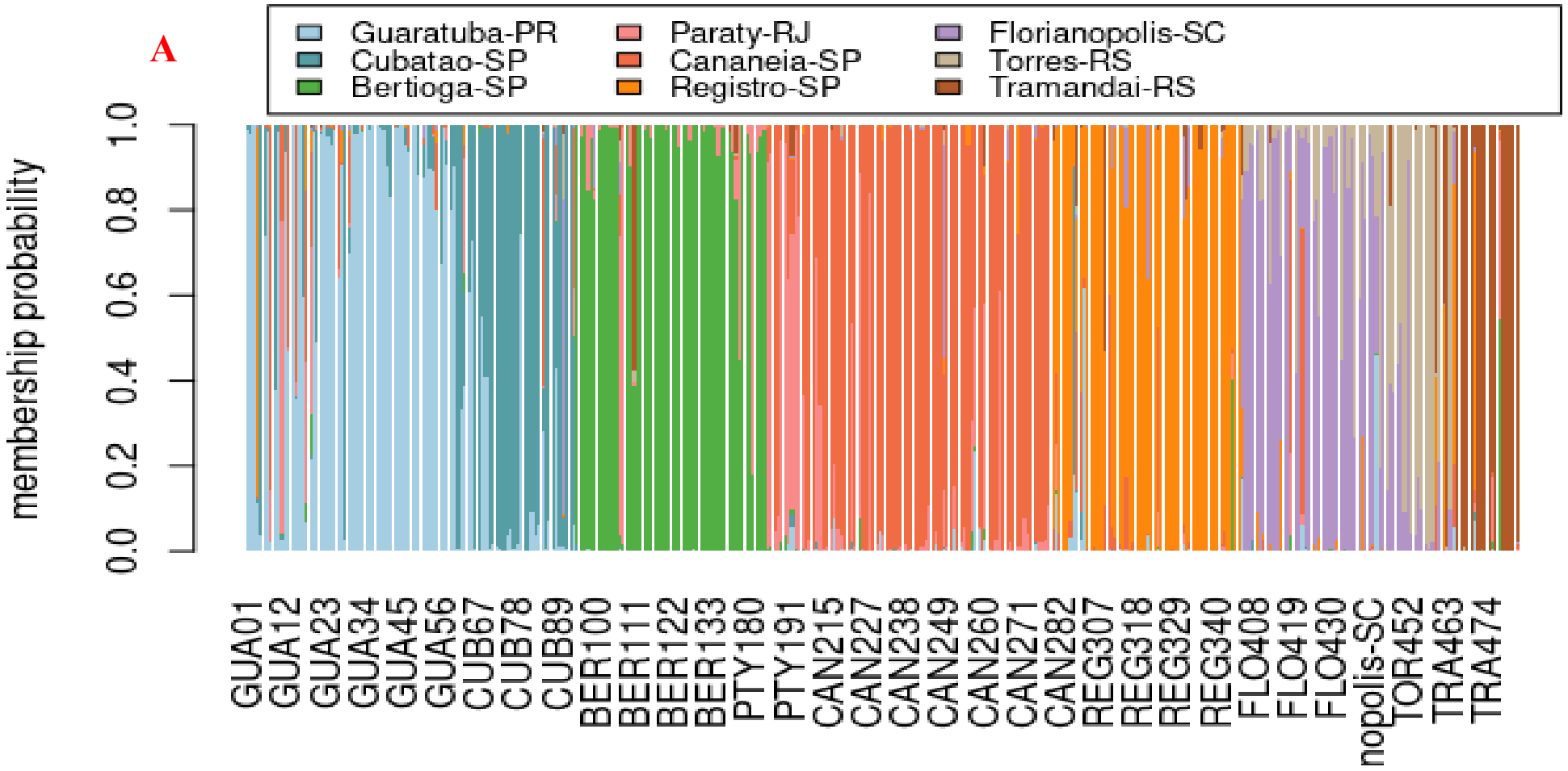
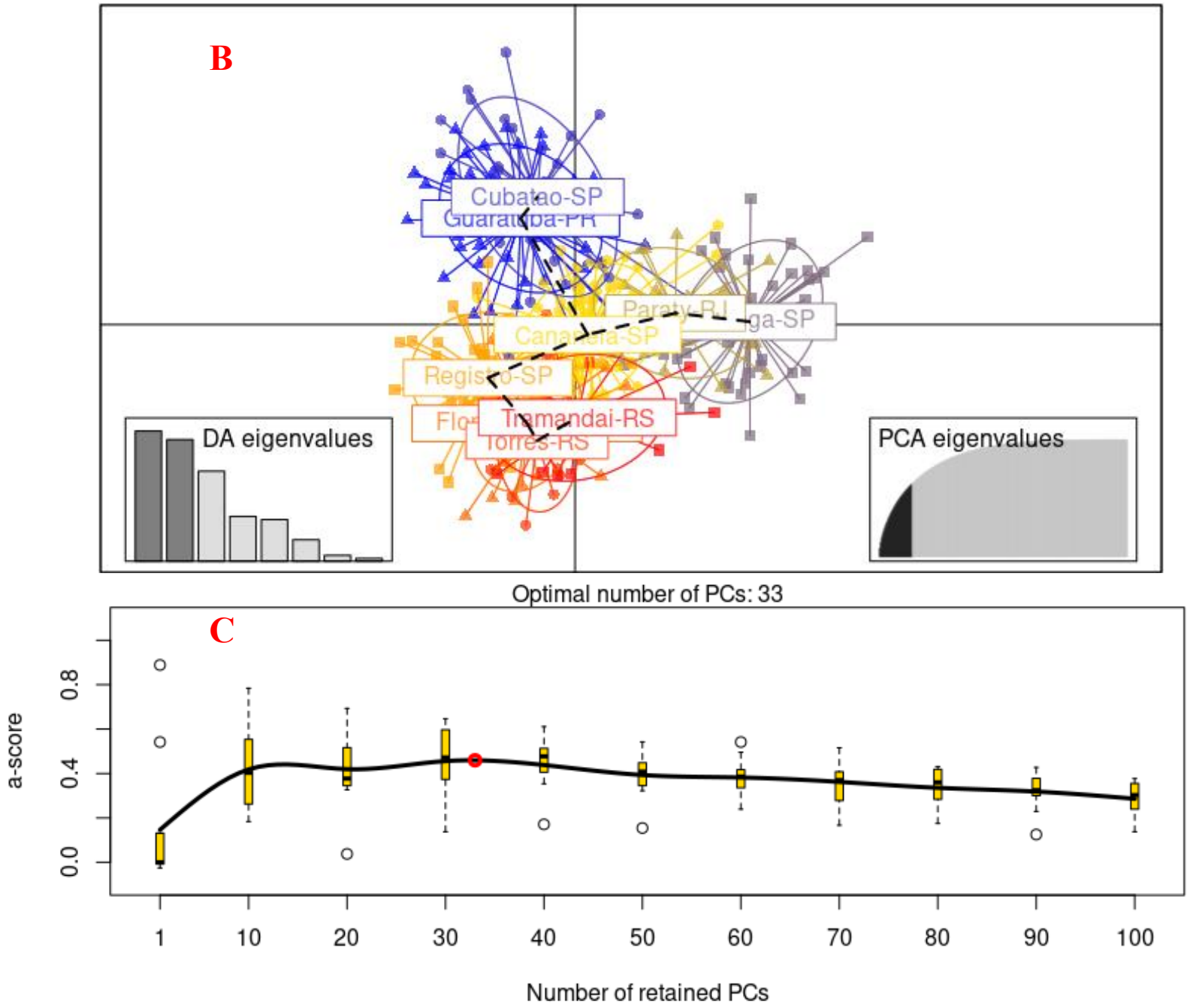


Figura 9 - Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) para investigar a estrutura genética da população de Centropomus parallelus. (A) cada barra vertical representa um indivíduo no diagrama DAPC e cada cor representa a probabilidade de pertencer a um dos grupos genéticos; (B) representação da DAPC num gráfico em ScatterPlot para agrupamento das populações amostradas e (C) número de componentes principais




B
Cubatao-SP
Guaratuba-PR
Paraty-RJ
ga-SP
Canasvieiras-SP
Registro-SP
Tramandai-RS
Torres-RS
DA eigenvalues
PCA eigenvalues
Optimal number of PCs: 33
C
a-score
0.0
0.4
0.8
1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Number of retained PCs

Para corroborar e atestar a estruturação genética observada na análise DAPC, foi estimado o índice de diferenciação genética *Dest* (Tabela 11) proposta por Jost (2008). Os níveis de diferenciação podem ser classificados como baixo (valores abaixo de 0,05), moderado (0,05 a 0,25) e alta (acima de 0,25). As populações de Cubatão e Guaratuba se mostram estruturadas quando comparadas as demais, porém quando comparadas entre si esse índice cai para 0,05 significando baixa à moderada estruturação.

Tabela 11- Abaixo da diagonal principal representando o índice *Dest* para diferenciação populacional de animais da espécie *C. paralellus* amostrados em nove localidades (Guaratuba- PR (GUA); Cubatão- SP (CUB); Bertioga- SP (BER); Paraty- RJ (PTY); Cananéia- SP (CAN); Registro- SP (REG): Florianópolis- SC (FLO); Torres- RS (TOR); Tramandaí- RS (TRA), acima da diagonal principal encontram-se os intervalos de confiança.

	GUA	**CUB**	**BER**	**PTY**	**CAN**	**REG**	**FLO**	**TOR**	**TRA**
GUA		(0,025 - 0,099)	(0,254 - 0,362)	(0,170 - 0,298)	(0,170 - 0,271)	(0,185 - 0,279)	(0,214 - 0,316)	(0,184 - 0,322)	(0,221 - 0,355)
CUB	0,05		(0,188 - 0,326)	(0,129 - 0,270)	(0,174 - 0,277)	(0,177 - 0,284)	(0,205 - 0,326)	(0,219 - 0,375)	(0,255 - 0,398)
BER	0,30	0,25		(0,033 - 0,172)	(0,164 - 0,235)	(0,239 - 0,353)	(0,178 - 0,305)	(0,167 - 0,301)	(0,167 - 0,312)
PTY	0,23	0,19	0,09		(0,015 - 0,129)	(0,176 - 0,293)	0,234 - 0,344)	(0,207 - 0,363)	(0,143 - 0,283)
CAN	0,21	0,22	0,19	0,06		(0,146 - 0,235)	(0,226 - 0,317)	(0,159 - 0,308)	(0,198 - 0,313)
REG	0,23	0,22	0,29	0,22	0,18		(0,075 - 0,168)	(0,045 - 0,189)	(0,124 - 0,263)
FLO	0,26	0,26	0,23	0,28	0,26	0,11		(-0,035 - 0,075)	(0,152 - 0,295)
TOR	0,25	0,29	0,22	0,28	0,23	0,11	0,01		(0,101 - 0,277)
TRA	0,29	0,32	0,23	0,21	0,25	0,19	0,22	0,18	

Os valores apresentados de *Dest* revelam uma estruturação genética de moderada à alta (0,01-0,32) para as populações de *C. parallelus*, exceto entre as populações de Florianópolis e Torres que apresentou índice de diferenciação de 0,01.

3.3.4 Complexo Estuarino Cananéia-Iguape

Na análise regional do complexo estuarino de Cananéia- Iguape foram encontradas dezesseis componentes principais (Figura 10-C), posteriormente é possível observar que as populações formaram três agrupamentos genéticos (Figura 10- A).

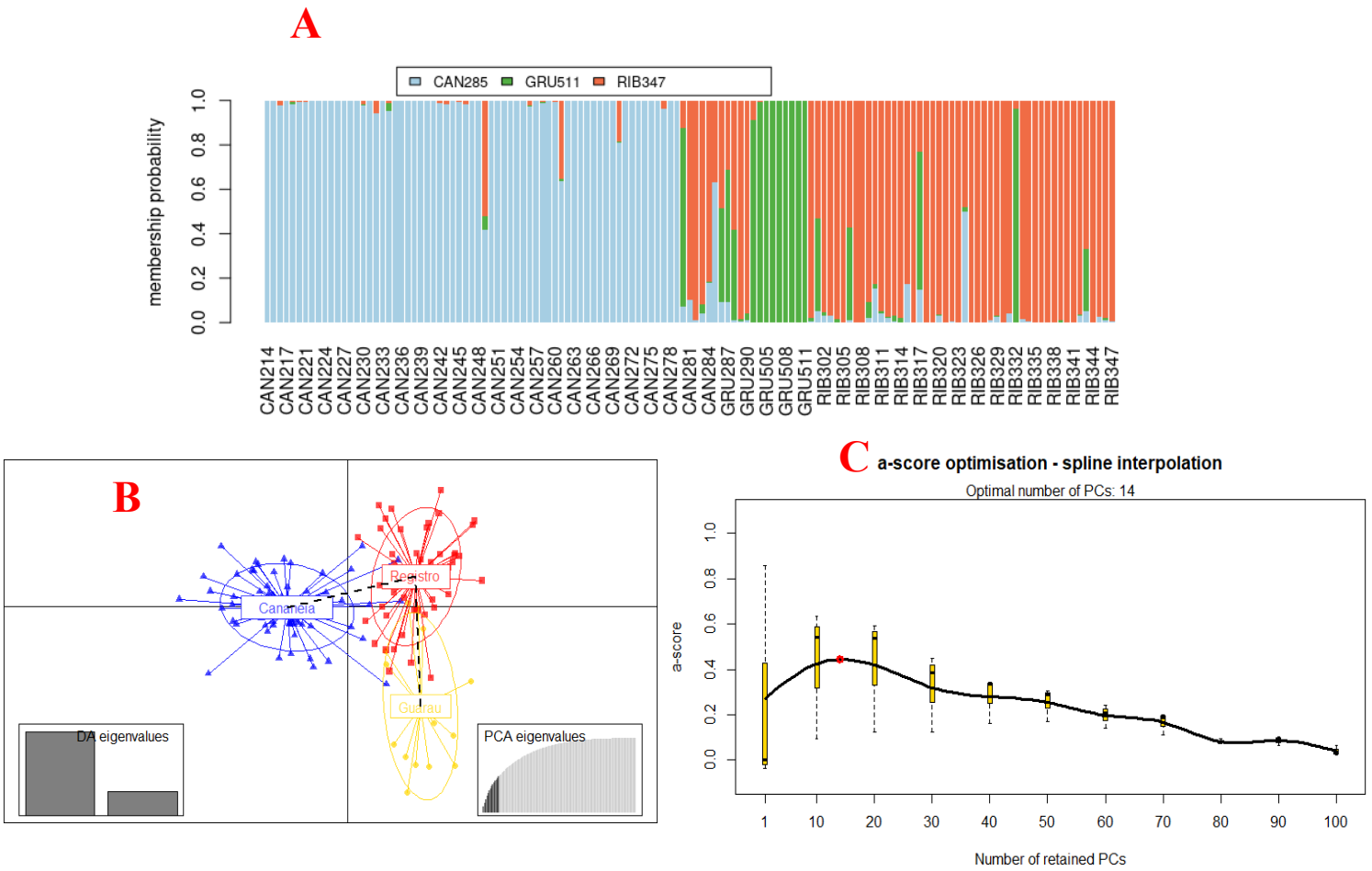
As populações oriundas de Guaraú e Registro se diferem de Cananéia na disposição gráfica em *ScatterPlot* (Figura 10- B), nota-se que os indivíduos de Guaraú possui conectividade com Registro, porém com Cananéia parece se isolar das demais. Na tabela 12 ficam evidenciadas a

separação em três populações, sendo estas: Cananéia- SP (CAN); Registro- SP (REG) e Guaraú-SP (GRU).

Tabela 12 - Abaixo da diagonal principal representando o índice *Dest* para diferenciação populacional de animais da espécie *C. paralellus* amostrados em três localidades (Guaraú, Registro e Cananéia) e intervalo de confiança representados acima da diagonal principal.

	Cananéia	**Guaraú**	**Registro**
Cananéia	*	0,14- 0,28	0,14-0,23
Guaraú	0,19	*	0,08-0,25
Registro	0,18	0,15	*

Figura 10 - Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) do Complexo estuarino Cananéia-Iguape. (A) cada barra vertical representa um indivíduo no diagrama DAPC e cada cor representa a probabilidade de pertencer a um dos grupos genéticos; (B) representação da DAPC num gráfico em ScatterPlot para agrupamento das populações amostradas e (C) número de componentes principais



3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Diversidade genética intrapopulacional

A estrutura genética de uma população pode variar consideravelmente de espécie para espécie e muitas vezes de formas que não podem ser previstas. Em alguns determinados casos populações parecem ser mais homogêneas do que esperado, outras mais heterogêneas (WARD, 2006). A dispersão e o fluxo gênico determinam até que ponto populações estão geneticamente ligadas e adaptada localmente, influenciando sobre a decisão de quais ações devem ser implementadas para gestão desses estoques (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006; LENORMAND, 2002).

Apesar de lacunas de conhecimento em relação à pesca, acredita-se que ainda há bases genéticas para aprimorar a atividade pesqueira inclusive na gestão dos ecossistemas marinhos em função das adaptações às alterações climáticas (BRANDER, 2010). Para isso, é de extrema importância que se mantenha a variabilidade genética garantindo as chances de sobrevivência das populações a longo prazo, diante disso é possível determinar a adaptabilidade dessas populações às alterações ambientais, como por exemplo as mudanças climáticas recentes (NEAVE *et al.*, 2015).

Face a isso, acessar a variabilidade genética, estabelecer a magnitude da conectividade entre estoques e o nível de estruturação dos recursos marinhos são medidas fundamentais para garantir a as chances de sobrevivência dessas populações a longo prazo, conhecer a ecologia e biologia evolutiva das espécies e permitir o delineamento de medidas para conservação. Além do mais, conhecer a variabilidade, compreender a conectividade e a estrutura genética de populações de uma dada espécie, por meio de estimativas, são etapas fundamentais para um melhor entendimento de sua ecologia, biologia evolutiva e para posterior estabelecimento de medidas de conservação (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

A estruturação populacional pode em um primeiro momento resultar em perda de variação genética pelo decréscimo de heterozigosidade nas subpopulações derivadas quando comparada com a heterozigosidade esperada na população original, desta forma, uma maneira de estimar essa variabilidade genética de uma população é calculando-se a heterozigosidade (WRIGHT, 1951).

No presente estudo, a heterozigosidade observada (Ho) foi menor do que a heterozigosidade esperada (He), além disso o F_{IS} positivo (indicativo endogamia) proposto por

Wright (1951), pode variar de -1 a +1. Valores positivos indicam excesso de homozigotos e podem justificar o afastamento do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) das populações amostradas. De modo geral, o F_{IS} (Tabela 7) foi positivo em todas as localidades indicando excesso de homozigotos, já o coeficiente de endogamia (Tabela 9) dos locais amostrados apresentaram índices muito próximos todos abaixo de 0,5 (exceto Registro), portanto podemos considerar essas populações como sendo moderadamente endogâmica.

Ao compararmos o coeficiente de endogamia da população de Paraty (Tabela 9) e o Fis (Tabela 7) é possível notar que os valores são semelhantes as outras localidades, no entanto em relação ao *N*e, essa população apresentou menor número efetivo populacional *N*e=51,4 chamando a atenção para que haja monitoramento dessa métrica garantindo a sobrevivência desses indivíduos ao longo do tempo, uma vez que o *N*e pode ser considerado a dimensão efetiva da população.

De acordo com Frankham (1995), o *N*e é uma medida genética dos tamanhos mínimos viáveis para assegurar a sobrevivência a longo prazo de uma dada população referindo-se ao número de indivíduos reprodutores que contribuem para a geração seguinte, e é caracteristicamente menor do que a dimensão da população recenseada, com outras palavras, *N*e é o número de indivíduos reprodutores que efetivamente contribuem para produzir descendentes para a geração seguinte.

O maior Ne encontrado foi em Registro (469.9), seguido de Florianópolis e Cananéia, 326.9 e 239.7 respectivamente. Apesar de não haver um valor fixo como referência para essa medida no contexto da genética de conservação, foi sugerido um *N*e mínimo de 500-5.000 como necessário para assegurar que as populações não percam a seu potencial evolutivo por outro lado, em muitas espécies marinhas o *N*e pode ser de magnitude inferior ao tamanho da população recenseada (N) (FRANKLIN; FRANKHAM 1998; HAUSER; CARVALHO, 2008).

Estabelecer tamanhos populacionais mínimos viáveis é um dos principais objetivos da genética de conservação. Ao chegar a tais tamanhos mínimos é necessário considerar todos os aspectos da biologia das espécies envolvidas, e não apenas a genética, critérios importantes devem ser levados em conta como a demografia e a história de vida das espécies e variáveis ecológicas, por exemplo, a probabilidade e gravidade da catástrofe (CANO *et al.*, 2008).

*N*e é frequentemente diversas ordens de magnitude inferior a N, podendo acarretar reduções severas no tamanho da população e perda de diversidade genética, como mostrado em alguns estudos onde houve reduções no Ne e, em muitos casos, levaram também a perdas previsíveis de variabilidade genética (HAUSER *et al.*, 2002; TURNER *et al.*, 2002; HUTCHINSON *et al.*, 2003; HOARAU *et al.*, 2005; PALSTRA; RUZZANTE, 2008).

Portanto, diante dos resultados obtidos do número efetivo populacional de *C. parallelus* nas localidades amostradas indica que há necessidade de uma gestão adequada, bem como o monitoramento do *N*e dessas populações garantindo o uso sustentável desses recursos genéticos a longo prazo.

Há poucos estudos sobre genética populacional do gênero *Centropomus*, no caso da espécie *C. parallelus* um único trabalho com DNA mitocondrial, utilizando o citocromo b como marcador, avaliou a diversidade genética de seis populações da costa do Brasil (Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Bahia, Sergipe e Maranhão) (PRODOCIMO *et al.*, 2008). Nesse estudo, índice de diversidade nucleotídica foi baixo (0,001–0,003), talvez pelo grau de conservação deste gene para estudos populacionais e a diversidade haplotípica não foi apresentada.

Já com o uso de marcadores nucleares podemos citar o trabalho de Anderson (2020), o qual avaliou populações distribuídas na costa do Texas e no Golfo do México obtendo valores de Fis entre 0,114 e 0,170 (p valor <0,01). Outro estudo reserva extrativista de Canavieiras utilizando o marcador nuclear ISSR, estimou a diversidade genotípica entre populações por meio do índice de Shannon o qual obteve resultados variando entre 0,3312 e 0,4399, esses valores foram classificados como baixa diversidade genotípica (FONSECA *et al.*, 2020). Estudos com genética de populações utilizando marcadores microssatélites são mais encontrados com a espécie *Centropomus undecimalis*, ainda, assim, poucos têm sido os trabalhos publicados com essa espécie (TRINGALI *et al*, 2008; HERNÁNDEZ-VIDAL *et al.*, 2014; PRIOLLI *et al.*, 2016; TERÁN-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

DeWoody e Avise (2000), em uma revisão da literatura, consideraram um total de 524 *loci* microssatélite em cerca de 40.000 indivíduos de 78 espécies, os peixes de água doce apresentaram níveis de variação genética da população (heterozigosidade média, h=0,46, e números médios de alelos por *locus*, a=7,5) relativamente semelhantes aos dos animais terrestres (h=0,58 e a=7,1). Em contraste, amostras da população local de peixes marinhos apresentaram em média heterozigosidade significativamente mais elevadas (h=0,79) e quase três vezes o número de alelos por *locus* (a=20,6). Já os peixes anádromos, aqueles que migram entre água salgada e doce, apresentam índices de h=0,68 e de a=11,3. No caso da espécie em estudo, os índices médios de heterozigosidade (0,734) está acima da média de outras espécies anádromas e número de alelos (8,76) está abaixo.

É importante considerar que o hermafroditismo sequencial tem o potencial de impactar na dimensão efetiva da população e limitar o número de indivíduos que desovam com sucesso

com um ou outro sexo, pois em teoria esse fato tem potencial de deprimir o *N*e e consequentemente aumentar a estrutura populacional, todavia ainda é mal compreendido como esta estratégia pode impactar na deriva genética (CHOPELET *et al.*, 2009).

3.4.2 Avaliação da diversidade genética interpopulacional na região Sul e Sudeste da costa do Brasil

A variação genética de uma determinada espécie aumenta sua capacidade de adaptar-se a um ambiente em mudança, sendo esse um fator necessário para sua sobrevivência. Essa variação genética surge entre os indivíduos resultando na diferenciação à nível populacional, de espécies e grupos taxonômicos. Dados dessa natureza têm diversas aplicações na investigação sobre evolução, conservação e gestão dos recursos naturais e programas de melhoramento genético (KRITZER; SALE, 2004).

Comumente indivíduos de uma mesma espécie podem formar grupos locais, porém se reproduzem de forma separada, esses grupos são chamados de subpopulações contudo, suas capturas elevadas podem levar a diminuição desses estoques. Para identificar situações como essa é necessário inicialmente que seja realizada uma avaliação da diversidade genética interpopulacional (ALLENDORF *et al.*, 2008).

Marcadores moleculares fornecem uma avaliação direta do padrão e distribuição da variação genética, auxiliando a responder questões como "se a população forma uma única unidade ou é composta de subunidades". Diversos fatores evolucionários afetam a quantidade e distribuição da variação genética entre as populações e, consequentemente causando a diferenciação dessa população (FERGUSON *et al.*, 1995; CHAUHAN; RAJIV, 2010). As estimativas de distribuição da variação genética entre as diferentes localidades amostradas foram calculadas pelo Dest de Jost (2008), que afere a diversidade interpopulacional por meio da diferenciação das frequências alélicas entre populações, gerando um valor máximo de 1 se as populações são inteiramente diferentes, ou seja, não compartilham nenhum alelo e um valor mínimo de 0 se não há diferenciação (panmixia).

Populações de *C. parallelus* da costa do Texas e no Golfo do México apresentaram um padrão proposta pelos autores como “estrutura genética caótica” (*chaotic genetic patchiness*), esse padrão consiste em uma estruturação que não pode ser explicada, essa hipótese foi sugerida uma vez que as populações apresentaram índice de parentesco elevado e as comparações em pares de Fst entre locais foram baixos, porém significativos Fst = 0.006 - 0.008 e p valor < 0.005 (ANDERSON *et al.*, 2020). Estudos anteriores sobre pequenas escalas espaciais também

apresentaram padrões de divergência genética “desorganizado”, porém significativos (ESCHBACH *et al.,* 2014; HAGEN *et al.,* 2015; TOLLEFSRUD *et al.,* 2016; CACCAVO *et al.,* 2018). No entanto no presente trabalho não sugerimos esse padrão, uma vez que foi encontrada estruturação genética de acordo com o índice Dest, o qual variou entre moderado a alto (exceto entre Torres e Florianópolis) na costa sul e sudeste do Brasil, além disso essas regiões possuem características particulares em sua formação geológica que justificam os resultados obtidos.

No Brasil, a diversidade genética de *C. parallelus* na reserva extrativista de Canavieiras foi analisada utilizando marcadores *Inter Simple Sequence Repeats*- ISSR, os resultados obtidos demonstraram que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações nos pontos amostrados devido ao compartilhamento de alelos em comum, além disso chegou à conclusão de que há um alto fluxo gênico entre as unidades amostrais (FONSECA *et al.,* 2020). Porém o ISSR, apesar de ser um marcador nuclear não é o mais indicado para utilização em estudos de genética de populações uma vez que exibe padrão de herança dominante tornando-se um fator limitante na identificação de homozigotos (RAMESH *et al.,* 2020).

No trabalho realizado por Prodocimo (2008), avaliando as populações de *C. parallelus* na costa do Brasil, os autores utilizaram o marcador citocromo b e os resultados não evidenciaram diferenciação genética entre localidades de coleta, indicando a existência de um fluxo de genes entre as populações estudadas. Contudo, o marcador usado, por ser um gene evolutivamente mais conservado do genoma mitocondrial é mais indicado para estudos de identificação molecular de espécies e estudos de filogenia (TELETCHEA, 2009; BRYJA *et al*., 2010).

Em relação a natureza do hermafroditismo sequencial nas aves e mamíferos, os padrões de dispersão entre os sexos são bem explorados, porém em espécies de peixes hermafroditas protândricas há um certo grau de complexidade na modelação genética dessas populações que até agora não tem sido muito estudado (CHOPELET *et al.,* 2009; YUE *et al.,* 2012). Ao observamos os resultados obtidos das populações pertencentes as regiões de Torres e Florianópolis, é possível notar grande conectividade entre esses pontos. A partir da análise DAPC, esses indivíduos apresentam fluxo gênico, dificultando a formação de agrupamentos distintos caso houvesse estruturação entre si. Esse resultado é corroborado pelo índice de diferenciação *Dest* o qual foi baixo entre Florianópolis e Torres, cujo foi de 0,01 com intervalo de confiança de -0,035 - 0,075, indicando possível panmixia entre essas populações.

Essa conexão pode ser justificada pela Confluência Brasil-Malvinas (CBM), no Sudoeste do Oceano Atlântico, onde as águas subtropicais transportadas pela Corrente do Brasil

(CB), que fluem na direção sul, encontram as águas subantárticas transportadas pela Corrente das Malvinas (CM) vinda da ilha de Falkland, em sentido oposto, compondo uma importante região influenciadora de processos físicos que ocorrem na interface oceano-atmosfera e extremamente dinâmica, considerada uma das áreas mais energéticas dos oceanos no planeta (WAINER *et al*., 2000; PEZZI *et al*., 2009; RUSSO, 2009). Ainda se tratando da conectividade dessas regiões, salienta-se que Marta-Almeida (2021) demonstrou que Florianópolis é influenciada pela descarga fluvial advinda da Lagoa dos Patos e pela presença da pluma do rio La Plata, corroborando que as baías de Florianópolis também são influenciadas pelos rios da região mais abaixo da América do Sul. Além disso, um trabalho realizado por Mafra (2020), o qual avaliou a variação zonal da CBM na temperatura da superfície do mar no sul do Brasil, observou a influência dessa confluência na reprodução da tainha (*Mugil liza*), espécie comumente encontradas em estuários e lagoas costeiras, concluindo a hipótese de que a variação zonal da CBM influencia na migração reprodutiva da espécie.

No caso do *C. parallelus,* essa espécie é encontrada preferencialmente em ambientes costeiros e estuarinos, além do que, possui grande plasticidade ambiental em termos de habitat, salinidade, residência e movimentação, sua desova costuma ocorrer perto da costa e após a eclosão as larvas se dispersam com as correntes para as regiões de estuário (RIVAS, 1986; DAROS *et al*, 2016). Dependendo da fase de vida, o robalo peva explora diferentes habitats, principalmente durante a primavera e verão migrando para ambientes de maior salinidade, garantindo a flutuabilidade dos ovos fertilizados (ALIAUME *et al.*, 1997; PETERS, 1998; SILVANO *et al.*, 2006). Essas informações em conjunto podem corroborar a hipótese de que a CBM pode estar influenciando na dispersão de ovos e larvas de *C. parallelus* no sul do país, uma vez que a espécie se reproduz em locais de estuário.

Em relação a Tramandaí, os índices de diferenciação genética comparando a região com Torres e Florianópolis foram de 0,18 e 0,22, respectivamente, indicando uma moderada estruturação genética. Nessa região, as amostras foram coletadas dentro do rio Tramandaí, o que sugere que a reprodução dessa espécie pode estar ocorrendo no Sistema Estuarino Tramandaí-Armazém localizado no limite entre os munícipios de Tramandaí e Imbé. Esse estuário é caracterizado como pequeno e de baixa profundidade, além disso é um ambiente naturalmente instável capaz de sofrer grande variação de salinidade induzida pelos fluxos de enchente e vazante provocados pelas alterações de nível no oceano devido a fenômenos meteorológicos e à descarga fluvial (CAMPELLO, 2006).

As lagoas costeiras da bacia do rio Tramandaí são muito importantes, pois são fonte exclusiva de água doce para a planície costeira norte no Rio Grande do Sul, sendo o rio

Tramandaí o canal mais importante recolhendo água de várias lagoas que se encontram na parte norte da bacia antes de desembocarem na lagoa Tramandaí. Este rio tem uma saída única para o Oceano Atlântico e sua entrada determina a direção principal do fluxo de água tanto do Norte como do Sul, destacando o fato de a região ser governada por um regime de micro marés (WÜRDIG, 1987; KAPUSTA, *et al.*, 2005).

A descarga de efluentes domésticos e industriais na bacia e a utilização da água para atender a população é expressiva, principalmente para irrigação nos meses de novembro a fevereiro, reduzindo geralmente os fluxos de água doce para estuários, modificando os processos de mistura estuarina e aumentando as influências marinhas mais para o interior. Essa dinâmica pode afetar negativamente a disponibilidade de água na zona costeira (LOITZENBAUER; MENDES, 2012). Estudo realizado por Hirschmann (2015) testou a hipótese de que as lagoas litorâneas nas Drenagens Costeiras do Sudeste do Brasil, das quais os rios Mampituba e Tramandaí fazem parte, poderiam limitar a dispersão de uma espécie ribeirinha *Cyanocharax itaimbe,* concluindo que há estruturação genética entre as populações amostradas explicada por fatores ecológicos que impedem o fluxo de genes entre os sistemas fluviais não obstante a sua ligação atual por água doce de lagoas costeiras. Essas características e atuais condições ambientais do estuário de Tramandaí-Armazém podem justificar a alteração das frequências alélicas das populações de *C. parallelus* no rio Tramandaí que sugere sua diferenciação das populações coletadas no rio Mampituba em Torres, que apesar de sua proximidade geográfica apresentou índice *Dest* de 0,187.

A população de Cananéia também se difere das demais com índices de estruturação genética assumindo valores acima de 0,05 e em alguns casos acima de 0,25, indicando estruturação de moderada à alta. O Sistema Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape é caracterizado por ser uma região submetida a impactos ambientais ainda incipientes, o Sul desta área compõe uma das regiões estuarinas mais preservadas do Brasil, além disso recebeu reconhecimento como Patrimônio Natural da Humanidade em 1999 pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura- UNESCO (BARCELLOS *et al.*, 2005)

O estuário de Cananéia é conhecido como Sistema ou Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape já que é formado por barra, ou seja, uma formação geológica que pode ser encontrada em desembocaduras de canais, estreitos, estuários, rios e outros cursos de água, nestes locais é comum haver uma linha de rebentação, devido à diminuição da profundidade, inclusive algumas barras podem formar ilhas, penínsulas, istmos etc. Após a inundação de vales primitivos de rios durante a transgressão marinha, pois a sedimentação recente ocasionou a formação de barras em sua desembocadura. No geral esse tipo de estuário é raso, com

profundidades que não ultrapassam 20-30 metros, e podem apresentar canais e lagunas extensas em seu interior, normalmente esse tipo de estuário é encontrado em regiões tropicais (MIRANDA, 2002; FONTES, s.d.).

De acordo Bilton (2002), ambientes estuarinos tendem a restringir o fluxo de genes e a sofrer pressões seletivas distintas, gerando populações fisiologicamente adaptadas e divergentes resultando em potencial especiação *in situ* por isolamento total ou parcial. A diminuição da troca de material genético combinado com condições ambientais variáveis, tais como salinidade e temperatura pode aumentar a divergência genética e a adaptação local das populações em zonas estuarinas (LEMAIRE *et al.*, 2000). Essas características podem sugerir uma explicação dos altos índices de estruturação genética da população pertencente aos estuários de Cananéia, Bertioga e Paraty.

O estuário de Santos-Cubatão está inserido em um sistema estuarino e lagunar que pode ser caracterizado como um estuário parcialmente estratificado, possui um canal longo e profundo (o Canal de Santos), o qual foi ideal para estabelecer um porto na região, sendo considerado o maior e mais ativo porto da América Latina. Na zona mais interior do estuário, no município de Cubatão localiza-se o centro industrial sendo a principal fonte de poluentes químicos descarregados no estuário e o ambiente marinho adjacente, tendo em conta a diversidade e quantidade dos atuais efluentes e a contaminação já existente (SCHMIEGELOW; GIANESELLA, 2014; CETESB, 2018).

Normalmente o aprofundamento de canais de navegação e o aterro de terraços de marés mudam as condições hidráulicas, a consequência desses eventos é específica para cada lugar, porém frequentemente causa um aumento na amplitude das marés e nas velocidades das correntes. Em estuários parcialmente estratificados a cunha salina pode se mover mais para o interior do estuário, aumentando a inserção salina induzindo mudanças nas condições de transporte de sedimento (AMORIM *et al.*, 2011).

O Canal de Bertioga está localizado no extremo oriental da região de Santos e é considerada uma ligação secundária com o oceano do sistema estuarino de Santos - São Vicente. O canal tem uma extensão de 25 km com uma profundidade média entre 3 e 6 m e largura variando entre 200 e 700 m (GOUVEIA SOUZA, 2015). Entre os canais de São Vicente e Bertioga há uma região de convergência (divergências) das correntes de inundação (refluxo), onde as ondas das suas extremidades encontram-se no Canal do Casqueiro, essa pressão é conhecida como Convergência Barotrópica ou “Tombo de Maré” e divide dinamicamente as cabeceiras dos estuários (HARARI; CAMARGO, 1998; WARNER *et al.*, 2003). Esse fenômeno possivelmente afeta os processos de reprodução, migração e recrutamento de

espécies estuarinas e estuarino-dependentes (COSER *et al.*, 2007). Desta forma, é possível que esses fatores hidrológicos possam a conectividade genética entre populações pertencentes aos estuários de Santos-Cubatão e Bertioga, principalmente durante os períodos larvais onde há baixa ação natatória.

A planície costeira de Bertioga está localizada na região metropolitana da Baixada Santista e apesar de restrita (inferior a 6 km de largura) contém quase todos os tipos de sistemas deposicionais que se encontram no resto da costa brasileira. Semelhante a outras planícies costeiras, a evolução geomorfológica de Bertioga foi associada a variações climáticas e do nível relativo do mar durante o período quaternário. Contudo, essa evolução foi também influenciada por impulsos tectónicos que produziram diversas características que apresentam características raras de eventos transgressivo-regressivos. Tais características foram afetadas por pelo menos dois impulsos tectónicos ao final do Pleistoceno e um impulso durante o Holoceno Médio a Alto (GOUVEIA SOUZA, 2015). As características físicas e geológicas desse estuário podem justificar os resultados obtidos oriundo da população de Bertioga o qual formou um único agrupamento (Figura DAPC) se separando inclusive da região de Cubatão, além disso o *Dest* destas localidades foi de 0,257 evidenciando uma alta estruturação.

Embora a estrutura de uma população necessite do isolamento reprodutivo dos indivíduos, as causas desse isolamento em populações estuarinas e marinhas ainda não são totalmente compreendidas. Acredita-se que os padrões de circulação oceânica, a temperatura da água, a geomorfologia costeira, e os requisitos ecológicos/ história de vida das espécies influenciem a estrutura nestes ambientes (DAWSON *et al.*, 2001; PLANES *et al*., 2001; GONZÁLEZ-WEVAR *et al*., 2015; CORTINHAS *et.al*, 2016).

No presente estudo foi verificado uma proximidade entre os agrupamentos formados pelas populações pertencentes aos estuários de Santos-Cubatão e Guaratuba, com *Dest* de 0,059 indicando moderada estruturação entre ambas. O estuário de Guaratuba possui uma barreira holocênica e tem uma relativa complexidade na sua evolução dado a quantidade de processos e componentes que influenciaram sua configuração até o estágio em que ela se encontra atualmente (BECKER, 2013). Além disso, compartilha processos de formação de sua planície costeira com estuários de São Paulo. A história do nível do mar na área é caracterizada por uma queda gradual de 3,5 m nos últimos 5.000 anos (ÂNGULO; LESSA, 1997).

O litoral paranaense está inserido na denominada Costa das Planícies Costeiras e Estuários, localizada entre São Vicente-SP e a Ponta do Vigia- SC, compondo um largo embaiamento e um litoral retificado de longos arcos de praia, extensas planícies costeiras e importantes estuários, como os de Santos e Cananéia, em São Paulo, Paranaguá e Guaratuba,

no Paraná, e São Francisco do Sul, em Santa Catarina (NOERNBERG *et al.*, 2008). Em decorrência da similaridade na estrutura desses estuários, os quais são formados por embaiamentos, supomos que a proximidade encontrada nas populações de Guaratuba e Cubatão possa ser explicada por uma conexão pretérita e não necessariamente há um fluxo gênico atual entre essas populações. É comum que haja segregação espacial entre espécies de peixes durante a fase juvenil e adulta ao longo de seu ciclo de vida esse fator, no entanto depende tanto da espécie como das características hidrodinâmicas da região, os robalos são peixes que adentram os estuários e rios de água doce nas diferentes fases de seu ciclo de vida (GILMORE *et al*., 1983; ALVAREZ-LAJONCHERE *et al*., 1982).

Estuários são ecossistemas de transição entre o continente e o oceano, sujeitos à intensa ação de forças físicas dando origem a uma grande complexidade de processos hidrodinâmicos. As interações entre os processos físicos conferem a esses sistemas uma grande variabilidade temporal e espacial, as quais vão condicionar a composição das comunidades biológicas (BARLETTA-BERGAN *et al.*, 2002). A longo prazo, os resultados obtidos podem promover diminuições desse recurso genético com efeitos de potencial prejuízo na dimensão das populações estudadas. Compreender o nível de conectividade, bem como a estrutura dos estoques genéticos entre os ambientes estuarinos e marinhos é essencial para uma gestão adequada ajudando a definir unidades de gestão (WAPLES *et al.*, 2008).

3.4.3 Complexo Estuarino Cananéia-Iguape

O complexo estuarino lagunar de Cananéia-Iguape está localizado no extremo sul da costa paulista, sua circulação é dirigida principalmente pela ação da onda de maré que entra pelas Barras de Cananéia e de Icapara e pela contribuição de água doce dos rios. São encontradas duas principais ligações oceânicas nesse sistema ligadas por um único canal (Mar Pequeno) localizado ao norte; quando chega na parte sul esse canal se divide em dois ramos, o Mar de Cananéia e o Mar de Cubatão, que por sua vez cercam a Ilha de Cananéia (MIYAO *et al.*, 1986; MIYAO; HARARI, 1989). Além disso, esse estuário é considerado o principal sistema estuarino-lagunar do litoral paulista e em conjunto com Vale do Rio Ribeira de Iguape, forma a maior área de planície costeira do estado de São Paulo (ITALIANI; MAHIQUES, 2014).

O rio Ribeira de Iguape é um curso de água que banha os estados do Paraná e de São Paulo, formando a bacia hidrográfica do rio Ribeira e desaguando ao norte do estuário de Cananéia formando Complexo Estuarino Lagunar de Iguape, Cananéia e Paranaguá,

denominada Vale do Ribeira (TAKINO; MAIER, 1987; SEVÁ FILHO; KALINOWSKI, 2012). O rio Guaraú tem cerca de 25 km de extensão e pertence a bacia Ribeira de Iguape, nasce na Serra da Juréia e desce por uma série de cachoeiras e corredeiras pela região norte onde encontra o rio Jacupiranguinha, formando posteriormente o rio Jacupiranga, que por sua vez deságua no rio Ribeira de Iguape (LOPES, 1994; COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIBEIRA DE IGUAPE E LITORAL SUL- CBH-RB, 2000).

As amostras pertencentes ao Sistema Estuarino Lagunar Cananéia-Iguape demostraram níveis moderados de estruturação de acordo com o índice de diferenciação *Dest*, no entanto, essas populações podem se conectar geograficamente dado que o robalo-peva depende do estuário para se reproduzir e as localidades estão ligadas pelo rio ribeira de Iguape que desagua no Mar Pequeno. Assim, cardumes de robalo-peva podem migrar para o sul do estuário em Cananéia ou a norte em Iguape. No entanto, no Mar Pequeno próximo a região da Pedra do Tombo, ocorre o encontro das ondas de maré provenientes das duas barras, nessa região foram observados menores valores de salinidade, de mínima variação desta com a fase da mare. A água doce que entra nesse trecho do Mar Pequeno de rios ou de origem subterrânea, parece se acumular ali devido à baixa taxa de renovação das águas locais (MINIUSSI, 1959; MYAO *et al.*, 1986).

A caraterística geomorfológica da região pode atuar como uma barreira semipermeável em relação a conectividade genética entre áreas deste estuário, o que sugere as diferenciações genéticas da população de Cananéia. Quando avaliados isoladamente, a população de Cananéia apresentou índices mais elevados de diferenciação populacional daqueles encontrados entre Registro e Guaraú, como pode ser visto na Tabela 12 e Figura 10. Esses resultados sugerem que ocorra uma maior conexão reprodutiva entre os indivíduos de Registro e Guaraú. Além do mais, as amostras pertencentes a população do rio Guaraú foram identificadas todas como machos e grande parte das amostras de Registro eram fêmeas (Domingos Garrone Neto, comunicação pessoal 2022). Portanto a amostragem dessas regiões pode ter sido composta por indivíduos que não pertenciam a um mesmo estoque e até mesmo possam estar em épocas de reprodução distintas justificando a estruturação genética obtida.

Em relação a essas populações sugere-se mais estudos aumentando o tamanho amostral dessas localidades, inclusive abranger a região norte do estuário, especificamente em Iguape para corroborar a hipótese acima. Estudos voltados para o congênere *C. undecimalis* indicaram que cerca de 40% de adultos permanecem nos rios durante os meses de desova, em um período de “repouso reprodutivo” enquanto outros se deslocam para os estuários para se reproduzir (BLEWETT *et al*., 2009; TROTTER *et al*., 2012).

Trotter (2012) observou 15 espécimes de robalos que foram classificados como residentes, que permaneceram dentro da porção de maré do rio durante o estudo, ou como migrantes, que completaram as migrações para fora da área de estudo. O total de 27% dos robalos marcados neste estudo não saiu do rio durante o tempo em que foram seguidos, nove deixaram o rio pelo menos uma época de desova (abril-setembro), cinco destes migraram duas vezes; e dois destes migraram durante as três épocas de desova, fornecendo provas iniciais de desova saltada.

É importante ressaltar que o momento da migração e reprodução são fatores chave da história de vida dos peixes; não são apenas adaptações das populações aos seus ambientes, mas podem servir para aumentar o isolamento reprodutivo, promovendo uma maior divergência entre as populações (QUINN *et al*, 2000). Esse fenômeno pode acontecer também com a espécie *C. parallelus*, o que sugere que os indivíduos dessa espécie promovem migrações longitudinais dentro de estuários para se reproduzir em águas mais salinas próximas a bocas dos estuários. Daros *et al.* (2016), ao analisarem estruturas microquímicas de otólitos, observaram a possibilidade de haver populações residentes dessa espécie em Paranaguá-PR, uma vez que a plasticidade da espécie permite sobreviver em ambientes com grande variedade de salinidade e os sistemas de natação das larvas e pós-larvas não estão totalmente desenvolvidos, flutuando passivamente sobre as correntes de água durante o estágio de vida inicial.

No entanto, estudos de marcação e telemetria acústica se fazem necessários para corroborar os achados genéticos encontrados no presente estudo e os demais com microquímica de otólitos para corroborar as hipóteses tanto de conectividade latitudinal entre estuários como longitudinal entre populações de robalo-peva e, com isso, se estabeleça os padrões de os padrões migratórios e a utilização de habitats dessa espécie.

3.5 MANEJO REPRODUTIVO E CONSERVAÇÃO DO RECURSO GENÉTICO

A alta capacidade migratória e dispersão de ovos e larvas associada a fatores como alta fecundidade e grande potencial reprodutivo, permitem que os organismos marinhos possam alcançar extensos ambientes. Conhecer a estrutura genética desses organismos é fundamental para gestão eficiente desses recursos genéticos (AVISE, 1998; RABONE *et al.*, 2019).

Diante disso surgiu o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa (*Evolutionary Unit Significant*- ESU) o qual tem se tornado cada vez mais relevante para a conservação da natureza. ESU se baseia na estrutura genética da população e na diferenciação adaptativa, proporcionando uma base para a conservação, bem como um entendimento mais completo do

papel da evolução adaptativa na história natural das espécies (MORITZ, 1994; WAPLES, 1995; CASACCI *et al*., 2014).

Waples (1995) propõe o termo Unidade Evolutivamente Significativa- *ESU*, baseado em casos em que uma população (ou grupo de populações) é reprodutivamente isolada de outras unidades populacionais. Nos resultados obtidos não podemos determinar que não há fluxo gênico entre as populações para que possamos considerá-las uma ESU. No entanto há outro termo muito utilizado na biologia da conservação, o qual consiste em determinar unidades de espécies que devem ser geridas e conservadas separadamente (FRANKHAM 2011). No presente estudo, optou-se por utilizar o conceito de Unidade de Manejo (*Management Unit*- UM), pois auxiliam em questões de manejo a curto prazo; esse conceito se baseia em populações com divergência significativa das frequências alélicas e são geralmente definidas como populações demograficamente independentes (HEDRICK, 2001; PALSBØLL *et al.*, 2007).

Durante a última década, a utilização de marcadores genéticos em análises populacionais como um meio indireto de inferir se as subpopulações fazem parte de uma mesma UM tem aumentado substancialmente. Diante disso, propõe-se que as populações coletadas em Cananéia, Bertioga e Tramandaí sejam tratadas como unidades de manejo distintas, já Guaratuba-PR e Cubatão- SP; Florianópolis- SC e Torres- RS; podem ser tratadas como a mesma unidade de manejo e conservação, objetivando manter padrões regionais de diferenciação genética uma vez que estas localidades apresentam fluxo gênico.

Tais unidades de manejo são populações demograficamente independentes, cuja dinâmica populacional depende basicamente da população local e não de taxas de migração, sendo necessário um monitoramento e gerenciamento específico e de grande importância para conservação das populações selvagens (PALSBØLL *et al.,* 2007; HALLERMAN; HILSDORF, 2014). Em relação ao manejo pesqueiro da espécie *C. parallelus*, delimitar tamanhos de captura mínimo e máximo esse estoque pode ser de grande valor para o monitoramento do seu status populacional.

O robalo-peva exerce um importante papel na economia de muitas populações costeiras seja como fonte de alimento advindo da pesca artesanal ou em torneios de pesca esportiva, podendo levar a diminuição desses estoques nessas localidades. Caso essa situação se torne realidade, diante dos resultados obtidos, não indicamos o repovoamento como uma medida mitigatória para recuperação de populações dessa espécie de peixe, uma vez que as populações amostradas se mostraram geneticamente distintas.

Diversas espécies têm sido alvo de tentativas e avaliações em relação a eficácia do repovoamento como método de aumento da pesca recreativa e comercial, alterações de curto prazo na variação genética e até mesmo a fim de avaliar a hipótese de homogeneização global da diversidade genética entre populações (LEBER *et al.*, 1995; SVÅSAND *et al.*, 2000; HERVAS *et al*., 2010; PERRIER *et al.*, 2013). O repovoamento de peixes com frequências alélicas muito diferentes da população natural pode resultar em modificações na magnitude da diversidade genética dentro e entre a população local e essa prática pode impactar negativamente a espécie, além de introduzir novas características de base genética podendo levar a uma redução da adaptação local (TAYLOR *et al.*, 1991; HANSEN, 2002; ARAKI *et al*., 2007; SANDOVAL-CASTILLO *et al.*, 2018).

No entanto essa hipótese deve ser corroborada com estudos futuros utilizando marcadores SNPs para a verificação de possíveis adaptações, haja vista que marcadores microssatélites não são os mais adequados para responder essa pergunta

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O presente estudo utilizando sequenciamento de nova geração desenvolveu um painel de 15 *loci* microssatélites espécie-específicos para *C. parallelus,* até o momento não havia publicado na literatura marcadores específicos para essa espécie. Portanto, recomenda-se a utilização deste painel em futuras análises genéticas para *C. parallelus*;
- ✓ Ressalta-se a importância de estudos com marcação centrados na compreensão do ciclo de vida da espécie e do seu comportamento migratório, porém, os resultados obtidos podem auxiliar programas de gestão, manejo e conservação deste recurso genético;
- ✓ As unidades de manejo indicadas devem ser tratadas como unidades populacionais individuais na formulação de políticas de pesca.
- ✓ De acordo com os resultados de heterozigosidade obtidos é possível que a espécie possa sofrer com a sobrepesca, portanto, se faz necessário o uso destes dados para gestão desse recurso genético garantindo sua sustentabilidade à médio e longo prazo;
- ✓ Propõe-se que seja determinado o tamanho mínimo e máximo para captura da espécie no estado de São Paulo uma vez que os indivíduos são hermafroditas sequenciais protândricos;
- ✓ Vale ressaltar que a conservação desta espécie requer a preservação de ambientes de água doce e marinhos, mas principalmente estuários, o que permite a conectividade entre esses habitats.
- ✓ Os resultados mostram que programas de repovoamento entre estuários não é recomendado como medida de reconstituição populacional
- ✓ Os presentes resultados com marcadores microssatélites sugerindo diferenciação populacional entre estuários abre novos campos de estudos com o uso de marcadores SNPs no sentido de se entender processos de adaptação local e geração de um painel mínimo desse marcador para desenvolvimento de um arranjo de marcadores diagnósticos para de forma automatizada possa essas populações serem monitoradas e manejadas no futuro.

REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics research international**, v. 2014, 2014.

ALIAUME, C. et al. Nursery habitat and diet of *juvenile Centropomus undecimalis* species in Puerto Rico estuaries. **Gulf Mex. Sci**. v. 2, p. 77 – 87 1997.

ALLENDORF, F. W. et al. Genetic effects of harvest on wild animal populations. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 23, p. 327–337, 2008.

ALVAREZ-LAJONCHERE, L. The fecundity of mullet (Pisces, Mugilidae) from Cuban waters. **Journal of Fish Biology**, v. 21, n. 6, p. 607-613, 1982.

AMORIM, E. et al. Assessment of metal and trace element concentrations in the Cananéia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 278, n. 2, p. 485-489, 2008.

ANDERSON, J. et al. Demographic, taxonomic, and genetic characterization of the snook species complex (*Centropomus* spp.) along the leading edge of its range in the northwestern Gulf of Mexico. North American Journal of Fisheries Management, v. 40, n. 1, p. 190-208, 2020.

ANGULO, R. J; LESSA, G. C. The Brazilian sea-level curves: a critical review with emphasis on the curves from the Paranaguáand Cananéia regions. **Marine Geology**, v. 140, n. 1-2, p. 141-166, 1997.

ARAKI, H. et al. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 100-103, 2007.

ASSIS, D. A. S. D. et al. Reproductive biology of the protandric hermaphrodite fat snook *Centropomus parallelus* Poey 1860 in a tropical estuary, northeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 54, n. 3, p. 225-235, 2019.

AVISE, J. C. Conservation genetics in the marine realm. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 377-382, 1998.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, n.2, p. 155-65, 2002.

BARCELLOS, R. L. et al. Distribuição e características do fósforo sedimentar no sistema estuarino lagunar de Cananéia-Iguape, estado de São Paulo, Brasil. **Geochimica Brasiliensis**, v. 19, n. 1, p. 22-22, 2005.

BARLETTA-BERGAN, A. et al. Structure and seasonal dynamics of larval fish in the Caeté River Estuary in North Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 54, n. 2, p. 193-206, 2002.

BECKER, A. et al. Potential effects of artificial light associated with anthropogenic infrastructure on the abundance and foraging behaviour of estuary-associated fishes. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2013.

BILTON, D. T.; PAULA, J.; BISHOP, J. D. D. Dispersal, genetic differentiation, and speciation in estuarine organisms. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, n. 6, p. 937-952, 2002.

BLEWETT, D .A. et al. Use of rivers by common snook Centropomus undecimalis in southwest Florida: a first step in addressing the overwintering paradigm. **Florida Scientist**, p. 310-324, 2009.

BRANDER, K. Impacts of climate change on fisheries. **Journal of Marine Systems**, v. 79, n. 3-4, p. 389-402, 2010.

BRYJA, J. et al. Range-wide population genetic structure of the European bitterling (*Rhodeus amarus*) based on microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 21, p. 4708-4722, 2010.

CACCAVO, J. A. et al. Along-shelf connectivity and circumpolar gene flow in Antarctic silverfish (*Pleuragramma antarctica*). **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

CAMPELLO, F. D. A Problemática da poluição por esgotos domésticos no sistema estuarino-lagunar Tramandaí-Armazén (RS, Brasil): física e química da água e a resposta dos macroinvertebrados bentônicos. 2006.

CASACCI, L.P. et al. The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. **Italian Journal of Zoology**, v.81, n2, p.182-193, 2014.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2018. **50 anos de história e estórias**. https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/ uploads/2018/12/Livro-CETESB-50-anos.pdf
CHAUHAN, T.; KUMAR, R. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CHISTIAKOV, D. A. et al. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1-29, 2006.

CHOPELET, J. et al. Sex change and the genetic structure of marine fish populations. **Fish and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 329-343, 2009.

CISNEROS-MATA, M. A. et al. Fisheries governance in the face of climate change: Assessment of policy reform implications for Mexican fisheries. **PloS one**, v. 14, n. 10, p. e0222317, 2019.

Comitê da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul CBH-RB. **Relatório do Diagnóstico da Situação dos Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul, 1**. 2000. Disponível em: https://sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/6836/planoribeira-html.htm. Acesso em: 08/11/2022.

CORTINHAS, M. C. et al. Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science,** v. 178, p. 148-157, 2016.

COSER, L. M. et al. Description of the ichthyoplanktonic community and its spatial distribution in the Piraque-acu and Piraque-mirim rivers estuary, Aracruz, Espírito Santo state, Brazil. **Interciencia**, v. 32, n. 4, p. 233-241, 2007.

CROWDER, L. B. et al. The impacts of fisheries on marine ecosystems and the transition to ecosystem-based management. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 259-278. (2008).

DAROS, F. A. et al. Habitat residency and movement patterns of *Centropomus parallelus* juveniles in a subtropical estuarine complex. **Journal of fish biology**, v. 88, n. 5, p. 1796-1810, 2016.

DAWSON, M. N. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 6, p. 723-736, 2001.

DEFAVERI, J. et al. High degree of genetic differentiation in marine three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). **Molecular Ecology**, v. 22, n. 18, p. 4811-4828, 2013.

DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of fish biology**, v. 56, n. 3, p. 461-473, 2000.

DO, C. et al. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. **Molecular ecology resources**, v. *14, n.* 1, p. 209-214, 2010.

ESCHBACH, E. et al. Population differentiation of zander (Sander lucioperca) across native and newly colonized ranges suggests increasing admixture in the course of an invasion. **Evolutionary applications**, v. 7, n. 5, p. 555-568, 2014.

FERGUSON, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 103-126, 1995.

FONSECA, V. L. et al. Análise da diversidade genética do robalo peva (*Centropomus parallelus*) na resex de Canavieiras, Bahia. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2180-2197, 2020.

FONTES, Aracy Losano. **ESTUÁRIOS E PLANÍCIES DE MARÉ**. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/15492216022012Geomofologia_Costeira_6.pdf. Acesso em: 30/10/2022.

FRANKHAM, R. et al. Predicting the probability of outbreeding depression. **Conservation Biology**, v. 25, n. 3, p. 465-475, 2011.

FRANKHAM, Richard. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetics Research**, v. 66, n. 2, p. 95-107, 19, 1995.
FRANKLIN, I. R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? In: **Animal Conservation forum**. Cambridge University Press, 1998. p. 69-70

GILMORE, R. G. et al. Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Scientist**, p. 313-336, 1983.

GLASS, J. R. et al. Phylogeography of two marine predators, giant trevally (*Caranx ignobilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*), across the Indo-Pacific. **Bulletin of Marine Science**, v. 97, n. 2, p. 257-280, 2021.

GONZÁLEZ-WEVAR, C. A. et al. Phylogeography in Galaxias maculatus (Jenyns, 1848) along two biogeographical provinces in the Chilean coast. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131289, 2015.

GOUVEIA SOUZA, C. R. de. The Bertioga Coastal Plain: an example of morphotectonic evolution. In: **Landscapes and landforms of Brazil**. Springer, Dordrecht, p. 115-134, 2015.

HAGEN, S. B. et al. Evidence of rapid change in genetic structure and diversity during range expansion in a recovering large terrestrial carnivore. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1807, p. 20150092, 2015.

HALLERMAN, E.; HILSDORF, A. W. S. Conservation genetics of tilapias: Seeking to define appropriate units for management. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 66,

HANSEN, Michael M. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (Salmo trutta) populations: An approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 6, p. 1003-1015, 2002.

HARARI, J.; CAMARGO, R. Modelagem numérica da região costeira de Santos (SP): circulação de maré. **Revista Brasileira de Oceanografia** v. 46, p. 135–156. 1998.

HAUSER, L. A. G. J. et al. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11742-11747, 2002.

HAUSER, L.; CARVALHO, G. R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. **Fish and Fisheries**, v. 9, n. 4, p. 333-362, 2008.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now?. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 629-636, 2001.

HELLBERG, M. E. et al. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of marine science**, v. 70, n. 1, p. 273-290, 2002.

HERNÁNDEZ-VIDAL, U. et al. Genetic variability of the Common Snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in connected marine and riverine environments. **Revista de Biología Tropical**, v. 62, n. 2, p. 627-636, 2014.

HERVAS, S. et al. Quantitative assessment of a white seabass (Atractoscion nobilis) stock enhancement program in California: Post-release dispersal, growth and survival. **Fisheries Research**, v. 105, n. 3, p. 237-243, 2010.

HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium1. **Genetics Research**, v. 38, n. 3, p. 209-216, 1981.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E.M. **Genetic resources of neotropical fishes.** 1ª edição. Editora: Springer, 2017.

HIRSCHMANN, A. et al. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. **Zoologica Scripta**, v. 44, n. 4, p. 374-382, 2015.

HOARAU, G. et al. Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa L.).* **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1562, p. 497-503, 2005.

HOFFMANN, A. A.; WILLI, Y. Detecting genetic responses to environmental change. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 421-432, 2008.

HUTCHINSON, W. F. et al. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1529, p. 2125-2132, 2003.

ITALIANI, D. M.; MAHIQUES, M. M. O registro geológico da atividade antropogênica na região do Valo Grande, Estado de São Paulo, Brasil. **Quaternary and Environmental Geosciences**, v. 5, n. 2, 2014.

JOST, L., G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, p.4015–4026, 2008.

KAMVAR Z. N. et al. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. **Front. Genet**. v. 6, p. 208, 2015.

KAMVAR Z. N. et al. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, v. 2, p. e281, 2014.

KAPUSTA, S. C. et al. Meiofauna structure in Tramandaí-Armazém estuary (South of Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 17, n. 4, p. 349-359, 2005.

KEENAN, K. et al. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in ecology and evolution**, v. 4, n. 8, p. 782-788, 2013.

KENCHINGTON, E. L. 14 The Effects of Fishing on Species and Genetic Diversity. **Responsible fisheries in the marine ecosystem**, p. 235, 2003.

KRITZER, J. P.; SALE, P. F. Metapopulation ecology in the sea: from Levins' model to marine ecology and fisheries science. **Fish and Fisheries**, v. 5, n. 2, p. 131-140, 2004.

KUMAR, G.; KOCOUR, M. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. **Fisheries Research**, v. 186, p. 11-22, 2017.

LEBER, K.M. et al. Marine enhancement with striped mullet: are hatchery releases replenishing or displacing wild stocks. In: **American Fisheries Society Symposium**. p. 376-387. 1995.

LEMAIRE, C. et al. F Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? **Molecular Ecology** v. 9, p.457–467, 2000.

LENNOX, R. J. et al. Evaluation of catch-and-release angling practices for the fat snook *Centropomus parallelus* in a Brazilian estuary. **Ocean & Coastal Management**, v. 113, p. 1-7, 2015.

LENORMAND, T. Gene flow and the limits to natural selection. **Trends in ecology & evolution**, v. 17, n. 4, p. 183-189, 2002.

LOITZENBAUER, E.; MENDES, C. A. B. Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil. **Ocean & coastal management**, v. 55, p. 52-62, 2012.

LOPES, R. M. Zooplankton distribution in the Guaraú river estuary (South-eastern Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 39, n. 3, p. 287-302, 1994.

MACHADO, M. R. F.; **Caracterização morfológica e bioquímica do sistema digestório e identificação por isótopos estáveis de Robalo Peva e Flexa selvagens e de cativeiro**. Jaboticabal: UNESP, 2011, 89p. Tese (Doutorado) Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2011.

MAFRA, E. O. et al. A influência da variação zonal da confluência Brasil-Malvinas na safra da tainha no estado de Santa Catarina entre os anos 2006 a 2016. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e13-e13, 2020.

MARTA-ALMEIDA, M. et al. Dynamics of river plumes in the South Brazilian Bight and South Brazil. **Ocean Dynamics**, v. 71, n. 1, p. 59-80, 2021.

MENDONÇA, M.C. F. B. **Autoecologia do camorim, *Centrpomus undecimalis* (Bloch, 1792), (Peciformes: Centropomidadae) em ambiente hipersalino em Galinhos, RN. Brasil**. São Carlos. UFSCar. Tese de Doutoramento, 145p. 2004.

MINIUSSI, I. C. Propagação da onda de mare em torno da Ilha de Cananéia–Contribuições avulsas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. **Oceanografia Física**, n. 2, 1959.

MIRANDA, Luiz Bruner. **Princípios de Oceanografia Física de Estuários Vol. 42**. Edusp, 2002.

MIYAO, S. Y. et al. Características físicas e químicas do sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 34, p. 23-26, 1986.

MORITZ, C. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 9, n. 10, p. 373-375, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2009. **Ocean Science Series**. Washington, DC: The National Academies Press. https://doi.org/10.17226/13353

NEAVE, L. E. et al. Implications of climate change for genetic diversity and evolvability in the UK**. Biodiversity Report Card paper**, NERC, n. 15, p.37, 2015.

NOERNBERG, M. A. et al. Environmental sensitivity assessment of Paraná coast for oil spill. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 49-59, 2008. p. 1-18, 2014.

PALSBØLL, P. J. et al. Identification of management units using population genetic data. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2007.

PALSTRA, F. P.; RUZZANTE, D. E. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence?. **Molecular ecology**, v. 17, n. 15, p. 3428-3447, 2008.

PERRIER, C. et al. Changes in the genetic structure of A tlantic salmon populations over four decades reveal substantial impacts of stocking and potential resiliency. **Ecology and evolution**, v. 3, n. 7, p. 2334-2349, 2013.

PETERS, K. M. et al. Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. **Bulletin of Marine Science**, v. 62, n. 2, p. 509-529, 1998.

PEZZI, L. P. et al. de. Multiyear measurements of the oceanic and atmospheric boundary layers at the Brazil-Malvinas confluence region, **Journal of Geophysical Research**., 114, 2009.

PLANES, S. et al. Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the Great Barrier Reef and the Coral Sea. **Evolution**, v. 55, n. 11, p. 2263-2273, 2001.

PRIOLLI, R. H. et al. Population genetic structure of an estuarine and a reef fish species exploited by Brazilian artisanal fishing. **Scientia Marina**, v. 80, n. 4, p. 467-477, 2016.

PRODOCIMO, V. et al. Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus* parallelus (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 8, p. 2075-2082, 2008.

QGIS DEVELOPMENT TEAM (2021) Qgis (Version 3.20.3 LTR). Available from: https:// qgis.org/en/site/ (accessed: 05 December 2022).

QUINN, T. P.; UNWIN, M. J.; KINNISON, M. T. Evolution of temporal isolation in the wild: genetic divergence in timing of migration and breeding by introduced chinook salmon populations. **Evolution**, v. 54, n. 4, p. 1372-1385, 2000.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

RABONE, M. et al. Access to Marine Genetic Resources (MGR): raising awareness of best-practice through a new agreement for Biodiversity Beyond National Jurisdiction (BBNJ). **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 520, 2019.

RAMESH, P. et al. Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies. **Journal of biosciences**, v. 45, n. 1, p. 1-15, 2020.

REEVES, P. A. et al. Effect of error and missing data on population structure inference using microsatellite data. **bioRxiv**, p. 080630, 2016.

RIVAS, L. R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus.* **Copeia**, p. 579-611, 1986.

RUSSO, L. **Interação Oceano-Atmosfera sobre o Atlântico Sudoestes na Região da Confluência Brasil-Malvinas.** Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, Brasil, 2009.

SANDOVAL-CASTILLO, J. et al. Seascape genomics reveals adaptive divergence in a connected and commercially important mollusc, the greenlip abalone (*Haliotis laevigata*), along a longitudinal environmental gradient. **Molecular ecology**, v. 27, n. 7, p. 1603-1620, 2018.

SCHMIEGELOW, J. M. M.; GIANESELLA, S. M. F. Absence of zonation in a mangrove forest in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 62, p. 117-131, 2014.

SELKOE, A.K; TOONEM, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, p.615–629, 2006.

SEVÁ FILHO, A.; KALINOWSKI, L. M. River diversion and hydropower plants: The unknown Ribeira Valley (states of Paraná and São Paulo). **estudos avançados**, v. 26, p. 269-286, 2012.

SILVANO, R. et al. When does this fish spawn? Fishermen's local knowledge of migration and reproduction of Brazilian coastal fishes. **Environmental Biology of fishes**, v. 76, n. 2, p. 371-386, 2006.

SVÅSAND, T. et al. The enhancement of cod stocks. **Fish and fisheries**, v. 1, n. 2, p. 173-205, 2000.

TAKINO, M; MAIER, M. H. ECOLOGIA DO RIO RIBEIRA DE IGUAPE: I í CONTEíÅ¡ DO IÔNICO E CLOROFILA. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 14, n. Ãºnico, p. 11-24, 1987.

TAYLOR, A. H.; HALPERN, C; B. The structure and dynamics of Abies magnifica forests in the southern Cascade Range, USA. **Journal of Vegetation Science**, v. 2, n. 2, p. 189-200, 1991.

TAYLOR, G.R. et al. Spawning rhythms of common snook in Florida. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 3, p. 502-520, 1998.
TELETCHEA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 19, n. 3, p. 265-293, 2009.

TENESA, A. et al. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. **Genome Research**, v. 17, p. 520–526, 2007.

TERÁN-MARTÍNEZ, J. et al. Molecular Characterization of the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) in the Usumacinta Basin. **Diversity**, v. 13, n. 8, p. 347, 2021.

TOLLEFSRUD, M. M. et al. Genetic structure in the northern range margins of common ash, Fraxinus excelsior L. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0167104, 2016.

TRINGALI, M. D. et al. Limits to the use of contemporary genetic analyses in delineating biological populations for restocking and stock enhancement. **Reviews in Fisheries Science**, v. 16, n. 1-3, p. 111-116, 2008.

TROTTER, A. A. et al. Migrations of common snook from a tidal river with implications for skipped spawning. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 141, n. 4, p. 1016-1025, 2012.

TURNER, T. F. et al. Genetic effective size is three orders of magnitude smaller than adult census size in an abundant, estuarine-dependent marine fish (*Sciaenops ocellatus*). **Genetics**, v. 162, n. 3, p. 1329-1339, 2002.

WAINER, I. et al. The Annual Cycle of The Brazil Malvinas Confluence Region in the NCAR Climate System Model. **Journal of Geophysical Research**, Estados Unidos, v. 105, p. 26167-26177, 2000.

WAPLES, R. S.; DO, C. H. I. Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. **Evolutionary applications**, v. 3, n. 3, p. 244-262, 2010.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular ecology**, v. 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.

WAPLES, R. S. et al. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? **Fish and Fisheries**, v. 9, n. 4, p. 423-449, 2008.

WAPLES, R.S. Evolutionarily Significant Units and the Conservation of Biological Diversity under the Endangered' Species Act. **American Fisheries Society Symposium**, v.17, p.8-27, 1995.

WARD, R. D. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. **Fisheries Research**, v. 80, n. 1, p. 9-18, 2006.

WARNER, J. C. et al. Tidal truncation and barotropic convergence in a channel network tidally driven from opposing entrances. Estuarine, Coastal and Shelf Science, v. 56, p.629-639, 2003.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag** New York, 2016.

WORM, B. et al. Rebuilding global fisheries. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 578-585, 2009.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323–354, 1951.

WÜRDIG, N. L. Alguns dados físicos e químicos do sistema lagunar de Tramandaí, RS. **Pesquisas em Geociências**, v. 20, n. 20, p. 49-74, 1987.

YAN, T. et al. Genetic analysis of wild *Ancherythroculter nigrocauda* in tributaries and the main stream of the upper Yangtze River basin of China. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 31, n. 1, p. 17-24, 2020.

YUE, G. H. et al. Evidence for female-biased dispersal in the protandrous hermaphroditic Asian seabass, *Lates calcarifer*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37976, 2012.

ZANE, L. et al. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.