

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALAN BONNER DA SILVA COSTA

**GENÉTICA BIOQUÍMICA DOS MORFOTIPOS DE *Coryphaena*
hippurus (ACTINOPTERYGII: CORYphaenidae)**

**Niterói
Janeiro 2015**

ALAN BONNER DA SILVA COSTA

**GENÉTICA BIOQUÍMICA DOS MORFOTIPOS DE *Coryphaena*
hippurus (ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE)**

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha.

Orientador:
Edson Pereira da Silva

**Niterói
Janeiro 2015**

ALAN BONNER DA SILVA COSTA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha.

Aprovado em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Pereira da Silva - GBM-UFF

Presidente

Prof. Dr. Rafael de Almeida Tubino - UFF

Titular

MSc. Michelle Rezende Duarte - PPGBMAC-UFF

Titular

Prof. Dr. Aguinaldo Nepomuceno Marques Júnior - GBM-UFF

(Suplente)

*“Coisas são semelhantes, por isso a ciência é possível.
Coisas são diferentes, por isso a ciência é necessária.”*

Richard Lewontin

Agradecimentos

Escrever estes agradecimentos é uma tarefa um tanto quanto desafiadora, por duas razões. A primeira é que este trabalho não marca só o fim de uma etapa acadêmica, como também o fim de um ciclo da minha vida. Vocês que participaram disto sabem o quanto eu mudei (por pressão ou por opção) desde que resolvi sair da minha cidade natal e me lançar neste sonho/desafio/projeto de vida de ser um cientista. Portanto, podem ter a certeza de que vocês são os principais responsáveis por todas as coisas boas que disso saiu e pelo cidadão e profissional que foi formado durante estes cinco anos e meio. Espero que eu seja motivo de orgulho para vocês assim como vocês são para mim, cada um a sua maneira.

O segundo motivo é que palavras não são o suficiente para demonstrar o quanto eu sou grato por todos que me ajudaram ao longo dessa caminhada. Mas é o que eu posso fazer no momento, além de tentar retribuir todas às coisas maravilhosas que vocês me proporcionaram até hoje. Porém, penso que não é possível em alguns casos. Por exemplo, como retribuir a altura tudo que meus pais fizeram por mim até agora? Sem eles não haveria chance, não haveria incentivo, não haveria condições, não haveria eu. Mas minha mãe sempre reforçou que ficaria feliz me vendo fazer o que eu gosto. Portanto, *parabéns papai e mamãe, o projeto de homem feliz de vocês está dando certo.* Desejo que vocês estejam tão realizados com isso como eu estou de ter chegado até aqui com a ajuda de vocês. Esperem mais e cobrem mais ainda, eu só comecei.

Não posso esquecer-me do restante da minha família, principalmente meus avós e tios, que bancaram parte desta aventura. Afinal, infelizmente, não se faz nada sem dinheiro. Mas sorte a minha de poder contar com vocês. A segurança que me passaram foi crucial para que eu me focasse apenas no necessário. Minha irmãzinha biológica, você também é parte disso. Foi estranho te ver crescer de longe, mas pode ter certeza que cada carinho, cada conversa, cada abraço, me deram muita força para continuar.

E o que dizer da família que eu formei fora de casa? Amigos que em alguns casos viraram irmãos que a vida me deu e que me fizeram muito feliz durante todo este tempo, estando eles perto ou longe. Alex (e Thai), Igor (e Marcela e Manoel), Fábio (e banda), Tony, Carol, Ninha, Joanhinha, Karlinha, Ju, Xulha, Stellinha, Melinão, Carlos (o primeiro de muitos), Loló, Menor, Piolho, Zé (valeu pelo emprego!), Menudo, Shrek, Fofão, Cogu, Coxinha, Paulista, Paulo, Augusto, Alvin, Silmar, Enfezado, Aava, Renata, Mariana, Igor, Maria Júlia, Felipe, Matheus, Fernando, Thiago, Bruno, Janie, Gabriela, Camila, Nathália... *São muitos amigos, não me sinto só!* Tenho palavras

especiais para cada um de vocês, mas não quero me estender. Só entendam: vocês são muito importantes e sou muito grato pelo o que cada um já fez por mim até hoje e pela amizade sincera, intensa e maravilhosa. Espero ser para vocês ao menos metade do que vocês são para mim.

Foi engraçado ver também a família que eu formei no Laboratório de Genética Marinha e Evolução. A começar do meu “pai acadêmico”, Edson. Meu querido, adjetivos me faltam para descrever o quanto eu te acho incrível. Mestre, obrigado por acreditar em mim, por me ensinar tudo o que ensinou até hoje e pela paciência e compreensão durante a concepção deste trabalho. Chefe, perdão por não ter feito disso aquilo que eu e você queríamos, mas nós dois sabemos as circunstâncias que levaram isso a (não) acontecer. Vou correr atrás do prejuízo, pode cobrar e esperar. Minha “irmã mais velha”, Michelle, muito obrigado por ensinar tão bem a técnica/o método e por estar sempre à disposição para me explicar tudo o que eu precisei para realizar esta monografia. Agradeço também pelas conversas além do âmbito acadêmico, que sempre fazem bem. E desculpe pelo mau jeito e pelos momentos de rebeldia! Qualquer um no seu lugar talvez tivesse perdido a cabeça comigo. Portanto, obrigado, acima de tudo, pela paciência. E aos “irmãos mais novos”, Izabel, Fernanda, Barta, Simone, Maíra, Laiz, Milena e Tate, obrigado por ajudarem a tornar o ambiente de trabalho tão agradável. Espero que vocês reconheçam, assim como eu, a experiência fantástica que é estar neste espaço e que a aproveitem da melhor forma possível.

No fim das contas, estes agradecimentos parecem soar mais como um pacto de compromisso em orgulhar os responsáveis por este passo na minha vida, mas é o meu jeito de dizer que eu sou eternamente grato por tudo que vocês me proporcionaram e que amo todos vocês. *Como diz o Criolo, só eu sei, o que eu passei*, e sem vocês não haveria nem o sufoco. Mal posso esperar pelo o que está por vir e me sinto preparado para o que quer que seja por ter vocês comigo. Muito obrigado por tudo, para sempre.

RESUMO

Coryphaena hippurus Linnaeus, 1758 é um peixe de importância comercial da zona epipelágica dos oceanos. Sua distribuição abrange às regiões tropicais e subtropicais. Pescadores da região de Cabo Frio/RJ identificam, na espécie, dois morfotipos conhecidos como *dourado* e *palombeta* que são comercializados por valores diferentes. Mais que isto, devido à questão da superexploração que afeta parte dos estoques de peixes brasileiros, o *status taxonômico* destes morfotipos assume grande relevância do ponto de vista da ecologia e biologia da pesca. Em função disto, o *status taxonômico* dos morfotipos de *C. hippurus* foi investigado geneticamente neste trabalho. Cento e dezessete indivíduos de *Coryphaena hippurus* (trinta e dois dourados e oitenta e cinco palombetas) desembarcados em Cabo Frio entre novembro de 2013 e abril de 2014 foram utilizados para análises genéticas pelo método de eletroforese de aloenzimas. Para a escolha dos *loci* gênicos foram feitos testes empíricos do tipo “tecido X enzima” utilizando-se o tampão descontínuo tris-hidróxido de lítio pH 8.0 (TLiOH). Trinta sistemas enzimáticos foram testados contra cinco tecidos (músculo, fígado, coração, gônada e olho) fornecendo resultados interpretáveis para dezenove *loci* gênicos (α -Est-1, α -Est-2, α -Est-3, β -Est-1, β -Est-2, β -Est-3, *G6pd*, *Ldh*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Me-1*, *Me-2*, *Odh-1*, *Odh-2*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod*, *Sordh* e *Xod*) em músculo, fígado e gônadas. Os dados obtidos a partir da interpretação dos padrões eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GENEPOL 4.2, BYOSIS-2, Fstat 2.9.3.2., PAST 2.08 e Excel gerando valores de frequências gênicas, porcentagem de *loci* polimórficos, número efetivo de alelos por *locus*, heterozigosidade média esperada e observada, índices de endocruzamento (f , θ e F), identidade gênica, bem como uma análise de componente principal (PCA) e um dendograma baseado nesta análise. A ausência de *loci* diagnósticos, juntamente com os dados de identidade gênica (0,935), número de migrantes por geração (3,083) e os valores não significativos para os índices de endocruzamento apontam para a homogeneidade dos conjuntos gênicos dos dois morfotipos indicando que, provavelmente, eles são populações de uma mesma espécie. Porém, as diferenças significativas entre as heterozigozidades e número efetivo de alelos dos *loci* entre os morfotipos, juntamente com desvios encontrados em relação ao esperado pela hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg para quatro *loci* apontam para a possível atuação de seleção natural sobre a variação gênica dos morfotipos, principalmente sobre o *locus Odh-1* que se encontra fora do equilíbrio para ambos os grupos. Esta enzima tem sido descrita na literatura como tendo atividade relacionada ao metabolismo da glicose, podendo estar envolvida com a natação explosiva. É possível, assim, elaborar um cenário onde a mortalidade diferencial explica as diferenças de frequência deste *locus* em *dourado* (possivelmente os indivíduos adultos de *C. hippurus*) em relação a *palombeta* (possivelmente os indivíduos jovens da espécie). As evidências, porém, não são suficientes para negar a hipótese neutralista, devido a pouca parcimônia comum às hipóteses de seleção natural. Outros marcadores moleculares, mais amostras, diferentes análises voltadas para testar a hipótese de seleção natural e uma maior riqueza de dados ecológicos sobre os morfotipos podem contribuir para um melhor entendimento do padrão de variação gênica amostrado neste trabalho.

Palavras-Chave: Sistemática bioquímica, Eletroforese de aloenzimas, Genética de populações, Recursos pesqueiros, Seleção natural.

ABSTRACT

Coryphaena hippurus Linnaeus, 1758 is a commercial fish which inhabits the epipelagic zone of the oceans. Its distribution is restricted to tropical and subtropical regions. Fisherman from Cabo Frio/RJ identify two morphotypes in the species known as *dourado* and *palombeta* which have different value in the market. Moreover, due to overexploitation affecting part of the Brazilian fish stocks, the definition of the taxonomic *status* of these morphotypes becomes relevant to management of the species. In this work, the taxonomic *status* of *C. hippurus* morphotypes was genetically investigated. One hundred and seventeen individuals of *Coryphaena hippurus* (thirty-two *dourados* and eighty-five *palombetas*) arrived at Cabo Frio/RJ between November/2013 and April/2014 were used for allozymes analysis. The *loci* selection was made by factorial empiric tests (tissue X enzyme X buffer) using discontinuous lithium hydroxide pH 8.0 (TLiOH) buffer. Thirty enzyme systems were tested against five tissues (muscle, liver, heart, gonads and eye), providing interpretable results for nineteen gene loci (α -Est-1, α -Est-2, α -Est-3, β -Est-1, β -Est-2, β -Est-3, G6pd, Ldh, Mdh-1, Mdh-3, Me-1, Me-2, Odh-1, Odh-2, Pgi, Pgm, Sod, Sordh and Xod) in muscle, liver and gonads. Data analysis was done using the software GENEPOL 4.2, BYOSIS-2, Fstat 2.9.3.2. and PAST 2.08. Results were in the form of gene frequencies, percentage of polymorphic loci, effective number of alleles per locus, expected and observed heterozygosity, inbreeding rates (f , θ and F), genetic identity and a principal component analysis (PCA). The absence of diagnostic *loci*, high value of genetic identity (0,935) and inferred number of migrants per generation (3,083) added to no significant values of inbreeding point to genetic homogeneity of the two morphotypes, indicating that they probably are populations of the same species. However, significant differences in heterozygosity and effective number of alleles between morphotypes and also significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium for four *loci* indicates a possible role for natural selection in shaping patterns of genetic variation in the species. This is especially true for *Odh-1 locus*, which shows deviations for both morphotypes. This enzyme has been described in the literature as having activity related to glucose metabolism and it may be involved with explosive swimming. Then it is possible to hypothesized that differential mortality can explain the differences in frequency observed for this *locus* in *dourado* (probably the adults of *C. hippurus*) and *palombeta* (probably the young individuals of the species). However, the evidence found in this work are not enough to contra pose the neutralist explanation that the pattern observed is purely due to chance. The conundrum of selectionist explanations is it lack of parsimony. Other molecular markers, more samples, ecological data and specific tests for the natural selection hypothesis are necessary before it can be better supported.

Keywords: Biochemical systematics, Allozyme electrophoresis, Population genetics, Fisheries, Natural selection.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. VARIAÇÃO GÊNICA: ORIGENS, RELEVÂNCIA E PERSPECTIVAS	1
1.2. ELETROFORESE DE ALOENZIMAS: A TÉCNICA, O MÉTODO E SUAS APLICAÇÕES	3
1.3. SISTEMÁTICA MOLECULAR	5
1.4. <i>CORYphaena hippurus</i>	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. COLETAS, TRANSPORTE E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS	8
3.2. ELETROFORESES	10
3.2.1. <i>Escolha de tecidos, enzimas e tampões</i>	10
3.2.2. <i>Homogeneização</i>	11
3.2.3. <i>Preparação dos géis</i>	11
3.2.4. <i>Corrida eletroforética</i>	11
3.2.5. <i>Revelação</i>	12
3.2.6. <i>Interpretação dos géis</i>	14
3.2.7. <i>Fixação dos géis</i>	14
3.3. ANÁLISE DE DADOS	16
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	33
7. BIBLIOGRAFIA	34
APÊNDICE: RESUMO APRESENTADO NO VI CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA	42
ANEXO A: DADOS DAS PESCAS DOS INDIVÍDUOS DE <i>CORYphaena hippurus</i> AMOSTRADOS NESTE TRABALHO	45
ANEXO B: DADOS DE BIOLOGIA DOS INDIVÍDUOS DE <i>CORYphaena hippurus</i> AMOSTRADOS NESTE TRABALHO	48
ANEXO C: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA CADA LOCUS AMOSTRADO	51
ANEXO D: TABELAS DE CONTINGÊNCIA PARA AS FREQUÊNCIAS GÊNICAS DOS LOCI AMOSTRADOS.	53
ANEXO E: RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS PARA DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS LOCI.	55

Índice de figuras

Figura 1 - Tecidos extraídos de <i>C. hippurus</i> para a execução das eletroforeses	9
Figura 2 - Mapa da região de Cabo Frio, com os pontos de coleta destacados.....	9
Figura 3 - Resumo do método de eletroforese de aloenzimas.....	15
Figura 4 - Diagrama de identidade gênica (Thorpe,1983)	26
Figura 5 - Valores médios dos coeficientes de correlação entre cada variável e o primeiro componente principal para a PCA realizada.....	27
Figura 6 - Dendograma gerado pela análise de aglomerados através da distância de Mahalanobis com os indivíduos analisados na PCA	27

Índice de tabelas

Tabela 1: Sistema de tampão utilizado e receita dos tampões de gel e eletrodo.....	10
Tabela 2: Enzimas usadas, com abreviações, número de comissão (E.C.), número de subunidades, número de <i>loci</i> interpretados, tampão e tecido utilizados.....	10
Tabela 3: Receitas dos sistemas de tampão usados para revelação.....	12
Tabela 4: Receitas dos sistemas enzimáticos revelados.....	13
Tabela 5: Frequências alélicas (N = tamanho da amostra para cada <i>locus</i>).....	23
Tabela 6: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H _o : união de gametas ao acaso).....	24
Tabela 7: Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por <i>locus</i> , grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas (Desvios-padrão entre parêntesis).....	24
Tabela 8: Heterozigosidades por <i>loci</i>	25
Tabela 9: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham com os intervalos de confiança para as médias por <i>Bootstrap</i>	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Variação gênica: origens, relevância e perspectivas

O pensamento moderno é moldado, particularmente, pelas ideias de quatro cientistas: Marx, Freud, Einstein e Darwin (GAY, 1989; TROMBLEY, 2014). O primeiro desenvolveu a teoria para compreensão do modo de produção capitalista e a interpretação de que o motor da história é a luta de classes (ENGELS & MARX, 1848). O psicanalista austríaco, por sua vez, defendeu a importância dos processos psíquicos inconscientes na determinação da vida cotidiana (FREUD, 1920). Já o físico alemão propôs a identidade espaço-tempo e sua importância para o fenômeno da gravitação universal (EINSTEIN, 1915).

A teoria evolutiva darwiniana, por fim, foi aquela que ofereceu uma nova visão para a biologia e para o modo de pensar sobre a natureza, graças à ruptura por ela proposta (LEVINS & LEWONTIN, 1985): uma perspectiva materialista da variação. Esta é a principal novidade trazida por Darwin e define que as diferenças entre os seres vivos não possuem uma essência, como se pensava até então. Para o naturalista inglês, a variação biológica é a realidade do mundo vivo (LEWONTIN, 1974). Tal perspectiva trouxe, também, uma nova visão sobre as espécies, que deixaram de ser entendidas como indivíduos imperfeitos em relação a um tipo ideal (perspectiva tipológica) e passaram a ser entendidas como conjuntos de populações (perspectiva materialista) (GOULD, 1977).

O processo de surgimento de novas espécies ganhou, também, uma nova roupagem com a teoria darwiniana. Este passou a ser entendido como a transformação de variação intrapopulacional em variação interpopulacional ao longo do tempo. Estas duas novas perspectivas quebraram com as ideias, até então vigentes, de progresso, perfeição, harmonia e equilíbrio relacionadas ao processo evolutivo, sugerindo que a biodiversidade não se organiza por uma ordem hierárquica pré-estabelecida (SILVA, 2001) e, sim, por um processo de descendência com modificação guiado pela seleção natural (DARWIN, 1859).

Por ter trazido novidades tão impactantes às concepções sobre a natureza, principalmente o novo conceito de variação, a teoria darwiniana sofreu algumas objeções na época de sua divulgação. A principal delas era a ausência de uma explicação para a origem e natureza da variação, isso é, de um mecanismo que explicasse como surgiram as diferenças entre os indivíduos das populações naturais que permitisse o processo de especiação (COYNE, 1994). A resposta para este problema

surgiu com a redescoberta do modelo de Gregor Mendel para explicar a hereditariedade que, incorporado à teoria evolutiva de Darwin, deu origem a Teoria Sintética da Evolução (MAYR & PROVINE, 1998).

A síntese evolutiva, proposta pelos “três gigantes” (Ronald Fisher, Sewall Wright e John Haldane), na década de 1930, sugere que a recombinação gênica, implícita no modelo mendeliano de herança, é o mecanismo que origina a variação necessária para que a mudança sugerida na teoria darwiniana ocorra (CROW, 1987). A partir da teoria sintética, o estudo da variação gênica passou a ser a tarefa primária para o estudo da evolução biológica e um novo ramo da biologia foi inaugurado: a genética de populações (BOWLER, 2003). A partir de então, o processo evolutivo ganhou, também, uma nova interpretação, passando a ser considerado a mudança das frequências dos genes das populações por ação de quatro forças evolutivas: seleção natural, deriva genética, mutação e migração (PROVINE, 1971). Duas destas forças são responsáveis por produzir a variação gênica. A mutação, que tem origem em erros do código genético, é a única que origina variação nova, enquanto a migração, que é o fluxo de genes entre as populações, insere cópias de genes já existentes em outras populações numa população que ainda não as possui. As outras duas são forças responsáveis pela alteração das proporções dos variantes nas populações, sendo uma dessas forças de natureza determinística (seleção natural, que era a força que regia o processo na concepção de Darwin e que consiste na persistência de determinados genótipos numa população em detrimento de outros em função das características que determinam nos indivíduos) e, a outra, de natureza estocástica (deriva genética, que é a oscilação das frequências dos genes nas populações devido ao acaso inerente a reprodução sexuada) (HARTL & CLARK, 2010; GRIFFITHS *et al.*, 2011).

Apesar da relevância que a variação gênica passou a ter para a teoria evolutiva no momento do estabelecimento da Teoria Sintética da Evolução, não se conhecia, até aquele momento, um método eficaz para amostrar a quantidade de variação presente nas populações naturais. Este problema perdurou até meados da década de 1960, quando foi elaborado o método de eletroforese de aloenzimas (AVISE, 2004).

1.2. Eletroforese de aloenzimas: a técnica, o método e suas aplicações

As técnicas de eletroforese são definidas como a migração de partículas eletricamente carregadas em soluções por um campo elétrico (VESTERBERG, 1989). Inicialmente, a eletroforese era uma técnica para estudos das propriedades físico-químicas das proteínas, por permitir a separação destes compostos, e eram utilizadas soluções aquosas como suporte para as amostras (TISELIUS, 1937). Com o avanço do desenvolvimento da técnica, passou-se a utilizar géis de diversos materiais (amido, poliacrilamida, agarose e acetato de celulose) como suporte para as amostras, o que permitiu uma melhor separação das proteínas e, consequentemente, uma melhor resolução nas análises das corridas eletroforéticas (VESTERBERG, 1993).

A eletroforese passou a ser utilizada em estudos sobre a variação gênica de populações naturais a partir de 1966, com Harris, estudando a raça humana (HARRIS, 1966) e Lewontin e Hubby, trabalhando com a espécie *Drosophila pseudoobscura* (HUBBY & LEWONTIN, 1966; LEWONTIN & HUBBY, 1966). O que permitiu a aplicação desta técnica como um método de amostragem de variação gênica em populações naturais foi a sua associação a um pressuposto: o de que o Dogma Central da Biologia Molecular (CRICK, 1970) estaria correto, isso é, que a variação amostrada em proteínas (como as aloenzimas, utilizadas neste tipo de trabalho) era correspondente a variação presente nas sequências de nucleotídeos dos indivíduos amostrados (LEWONTIN, 1991).

A aceitação deste pressuposto traz algumas limitações a este método, estando algumas delas relacionadas à quantidade de variação que ele é capaz de amostrar. Por exemplo, as substituições de aminoácidos que não mudam a carga das proteínas não são possíveis de serem detectadas, bem como alterações silenciosas no DNA (geralmente substituições na terceira base de códons) e a variação presente em regiões não codificantes, como os íntrons (RICHARDSON *et al.*, 1986). Mais do que isto, a variação amostrada por eletroforese de aloenzimas é fenotípica e, não, genotípica, o que leva a relativização dos conceitos de heterozigozidade e homozigozidade, pois trabalha-se com produtos dos genes e não diretamente com eles (UTTER *et al.*, 1987). Outras limitações estão relacionadas com a própria técnica em si, como a consistência dos géis, a efetividade dos tampões e, principalmente, às condições das amostras, cujas proteínas podem desnaturar caso não forem frescas e armazenadas corretamente (FERGUSON, 1980).

A despeito destas limitações, a eletroforese de aloenzimas é consolidada como um importante método nos estudos sobre variação gênica (SCHLÖTTERER, 2004), principalmente em relação às técnicas de DNA, que vem ganhando bastante popularidade no campo da genética de populações desde seu surgimento (SILVA & RUSSO, 2000). Estas restrições a tornam um método conservador, pois elas fazem que ele ofereça apenas uma subestimativa da variação total que uma população apresenta (VAN DER BANK *et al.*, 2001; PALSBØLL, 2009). Ainda assim, a eletroforese consegue resolver de modo eficaz problemas relacionados à genética de populações, principalmente no que diz respeito à sistemática alfa (KNOWLTON, 2000; CHUNG & CHUNG, 2012), a evidenciação da ação da seleção natural sobre populações naturais (SILVA, 2013), o manejo e conservação de espécies de interesse comercial, principalmente peixes, crustáceos, mexilhões (WARD & GREWE, 1994; CARVALHO & HAUSER, 1995; PARKER *et al.*, 1998; VAN DER HEYDEN *et al.*, 2014).

1.3. Sistemática molecular

Mesmo com as conquistas da teoria evolutiva darwiniana em relação às concepções de espécie, ainda existe, no âmago da biologia moderna, uma discussão sobre como delimitar estes grupos de forma que eles sejam, de fato, distintos e não ambíguos (MAYR, 1963). Existem, atualmente, cerca de vinte conceitos de espécie válidos (MAYDEN, 1997) e essa diversidade pode gerar variadas classificações para um mesmo grupo de organismos (MALLET & WILLMOTT, 2003). Isso gera alguns problemas, por exemplo, para a biologia da conservação que precisa lidar com unidades taxonômicas bem definidas, uma vez que objetiva o manejo de populações ameaçadas de extinção (ALEIXO, 2009). Portanto, definir estas unidades biológicas é fundamental para biologia, pois as espécies são categorias que representam um nível importante de integração do mundo vivo e, portanto, são essenciais para tornar o estudo da biologia praticável (MAYR, 1976).

A variação morfológica é o objeto mais tradicional da taxonomia e da sistemática (LARSON, 1998). Porém, por apresentar uma plasticidade muito grande, a morfologia acaba gerando classificações ambíguas ou imprecisas, agrupando várias espécies em apenas um grupo, gerando as chamadas espécies crípticas (KLAUTAU *et al.*, 1994; BICKFORD *et al.*, 2007). Com o advento dos marcadores moleculares surgiu a sistemática molecular, uma ferramenta que possibilita o diagnóstico de espécies baseado na variação gênica (o material de estudo da evolução biológica) e que não apresenta a plasticidade que ocorre nos caracteres morfológicos (HILLIS, 1987).

A sistemática bioquímica, um dos ramos da sistemática molecular, consiste na aplicação da eletroforese como método de detectar diferenças que possam permitir a classificação entre diferentes grupos (populações, morfotipos, subespécies etc.) (MORITZ & HILLIS, 1996). Quando diferentes alelos de um mesmo *locus* se apresentam fixados entre diferentes grupos em simpatria, é possível afirmar que estes grupos são discretos, ou seja, não estão trocando material genético (o chamado *locus* diagnóstico - AYALA & POWELL, 1972). Esta conclusão obedece ao corolário comum dos conceitos de espécie que é a identificação de uma unidade evolutiva independente e, portanto, permite conferir o *status* de espécies para os diferentes grupos analisados. A sistemática bioquímica possibilitou desvendar uma gama de espécies crípticas em moluscos (CORTE-REAL *et al.*, 1993), poliquetas (NYGREN, 2014), peixes (SOLÉ-CAVA & LEVY, 1987; LEVY & CONCEIÇÃO, 1989), entre outros.

1.4. *Coryphaena hippurus*

Coryphaena hippurus (Linnaeus, 1758) é uma espécie de peixe oceânica com grande capacidade natatória que ocorre na zona epipelágica de águas tropicais e subtropicais (PALKO *et al.*, 1982). Esta espécie apresenta um hábito migratório bastante ativo, o que sugere grandes tamanhos populacionais e alto fluxo gênico entre as populações (DÍAZ-JAIMES *et al.*, 2010).

Este recurso é bastante explorado pela pesca comercial e esportiva no Brasil (PIMENTA *et al.*, 2007). No estado do Rio de Janeiro, por exemplo, a pesca de *dourado* foi de 1.681 toneladas durante o ano de 2012, representando 2% da produção pesqueira marinha total do estado naquele ano (FIPERJ, 2013). Mais que isto, parte dos estoques pesqueiros brasileiros vem sofrendo uma diminuição devido à questão da superexploração, algo reconhecido até mesmo pelos pescadores artesanais do Sudeste do Brasil (BENDER *et al.*, 2014).

Em Cabo Frio, cidade costeira no estado do Rio de Janeiro, existe um caso interessante sobre a pesca e a comercialização de *C. hippurus*. Os pescadores desta localidade reconhecem, nos desembarques pesqueiros, dois morfotipos desta espécie. O morfotipo maior é denominado *dourado*, enquanto o menor é chamado por eles de *palombeta*, sendo, por esta razão, vendidos por valores diferentes nos mercados de peixe da região.

Desta forma, entender as relações entre estes grupos é importante não só no ponto de vista comercial como no ponto de vista da biologia pesqueira, a fim de oferecer uma melhor compreensão sobre este recurso para a facilitação de seu manejo. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o status taxonômico dos dois morfotipos de *Coryphaena hippurus* que ocorrem nos desembarques pesqueiros da cidade de Cabo Frio-RJ.

2. OBJETIVOS

- Investigar o status taxonômico de dois morfotipos da espécie *Coryphaena hippurus*, através do método de eletroforese de aloenzimas.
- Estimar os parâmetros básicos da genética de populações (frequências gênicas, número efetivo de alelos, grau de polimorfismo, heterozigozidade observada e esperada, probabilidades para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, índices de endocruzamento, identidade gênica e número de migrantes por geração) para os dois morfotipos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coletas, transporte e armazenagem das amostras

Um total de 117 indivíduos da espécie *Coryphaena hippurus* (32 do morfotipo grande - *dourado* e 85 do morfotipo pequeno - *palombeta*) foram amostrados neste trabalho. As amostras foram obtidas de desembarques pesqueiros realizados na região de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil) por pescadores deste local. Nas coletas, foram utilizados o espinhel de superfície (capturas em profundidade entre 100 e 160 metros para *dourado* e entre 60 e 140 m para *palombeta*) e a linha de mão (entre 60 e 140 metros de profundidade, apenas para *palombeta*) como artes de pesca. As capturas de *dourado* ocorreram entre os meses de novembro de 2013 e fevereiro de 2014, enquanto as capturas de *palombeta* ocorreram entre março e abril de 2014.

A dissecção de material para análise genética foi feita para cinco tecidos (músculo, fígado, gônada, coração e olho - Figura 1) os quais foram acondicionados em *eppendorfs* e identificados para cada peixe. O transporte até o Laboratório de Genética Marinha e Evolução (Niterói/RJ) foi realizado em gelo seco. No laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a execução das eletroforeses.

No Anexo A encontram-se as seguintes informações de coleta para cada espécime: nome da embarcação, estoque pesqueiro, data do desembarque, localização (latitude e longitude) da embarcação durante a captura, arte de pesca utilizada, profundidades mínima e máxima que cada coleta foi realizada e gradação comercial. No Anexo B, encontram-se dados de biologia registrados para os indivíduos amostrados (tamanho, peso total, peso do estômago, sexo, estágio de maturação, peso das gônadas, peso do fígado e peso do peixe após evisceração). Na Figura 2 estão marcadas as coordenadas geográficas disponíveis dos pontos de coleta. A área amostrada equivale a 3.806 Km², sendo a maior distância entre os pontos de 156 Km (“Leste de Cabo Frio” até “Cabo Norte”).

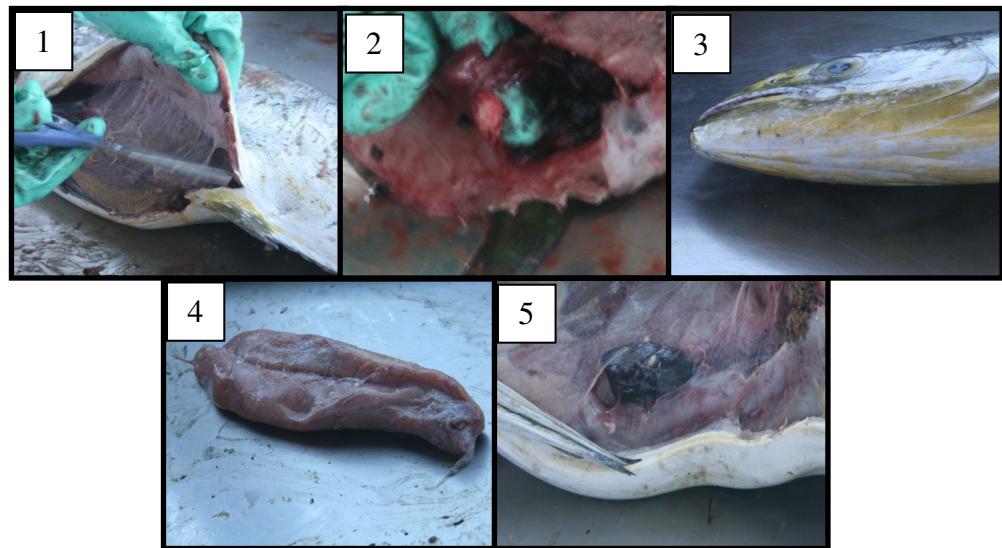


Figura 1: Tecidos extraídos de *C. hippurus* para a execução das eletroforeses: 1 - músculo, 2 - coração, 3 - olho, 4 - gônada, 5 - fígado. Fotos: Duarte, M.R.

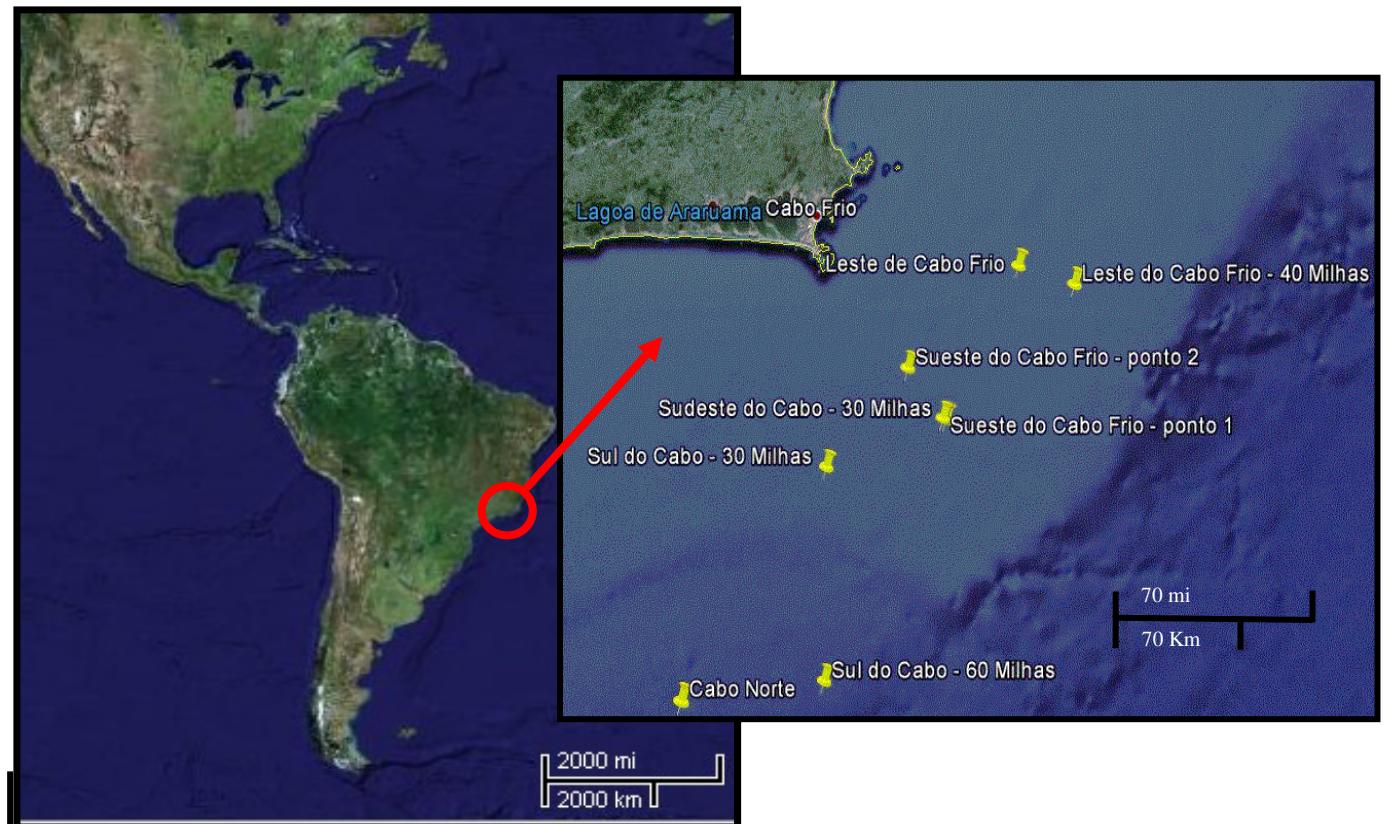


Figura 2: Mapa da região de Cabo Frio, com os pontos de coleta destacados.

3.2. Eletroforeses

3.2.1. Escolha de tecidos, enzimas e tampões

A primeira etapa do trabalho foi a realização de testes empíricos fatoriais do tipo Tecido x Tampão x Enzima. Nesse trabalho, foi testado um sistema de tampão, o Tris-hidróxido de lítio pH 8,0 (SELANDER *et al.*, 1971, Tabela 1) para 30 sistemas enzimáticos e os cinco tecidos descritos anteriormente. Foram obtidos resultados interpretáveis para 12 sistemas enzimáticos em músculo, fígado e gônadas (Tabela 2).

Tabela 1: Sistema de tampão utilizado e receita dos tampões de gel e eletrodo.

Tampão	Receita		Referência
	Eletrodos	Gel	
Tris-hidróxido de lítio pH 8,0 (TLiOH)	Hidróxido de lítio 2,51 g Ácido bórico 18,55 g Água destilada 1,0 L	Trizma base 3,63 g Ácido cítrico 1,05 g Água destilada 1,0 L	SELANDER <i>et al.</i> , 1971

Tabela 2: Enzimas usadas, com abreviações, número de comissão (E.C.), número de subunidades, número de *loci* interpretados, tampão e tecido utilizados.

Abreviação	Enzima	Nº E.C.	Nº sub.*	Nº loci	Tampão	Tecido
<i>α-Est</i>	Esterase, alfa	3.1.1.1	1	3	TliOH	Fígado
<i>β-Est</i>	Esterase, beta	3.1.1.1	1	3	TliOH	Gônada
<i>G6pd</i>	Desidrogenase da glucose 6 fosfato	1.1.1.49	2	1	TliOH	Gônada
<i>Ldh</i>	Desidrogenase do lactato	1.1.1.27	4	1	TliOH	Músculo
<i>Mdh</i>	Desidrogenase do malato	1.1.1.37	2	1	TliOH	Músculo
<i>Me</i>	Enzima málica	1.1.1.40	4	2	TliOH	Gônada
<i>Odh</i>	Desidrogenase do octanol	1.1.1.1	2	2	TliOH	Gônada
<i>Pgi</i>	Isomerase da glicose-6-fosfato	5.3.1.9	2	1	TliOH	Gônada
<i>Pgm</i>	Fosfoglicomutase	2.7.5.1	1	1	TLiOH	Músculo
<i>Sod</i>	Dismutase de superóxido	1.15.1.1	1	1	TliOH	Músculo
<i>Sordh</i>	Sorbitol desidrogenase	1.1.1.14	4	1	TliOH	Fígado
<i>Xod</i>	Oxidase da xantina	1.2.3.2	2	1	TliOH	Fígado

1 = monomérica; 2 = dimérica; 4 = tetramérica.

3.2.2. Homogeneização

Os tecidos foram homogeneizados em ambiente refrigerado com o auxilio de um bastão de vidro em uma placa de acrílico perfurada mantida sobre uma placa de vidro com gelo para evitar a proteólise e desnaturação das enzimas. Pedaços de papel de filtro (Whatman 3MM) de aproximadamente 2x15mm foram mergulhados no homogeneizado e, logo em seguida, colocados nos géis. Em cada gel, foi possível acondicionar 24 indivíduos.

3.2.3. Preparação dos géis

O gel suporte para a eletroforese horizontal foi feito de amido 12,5% (27,5g de amido em 220ml de tampão). A solução de amido foi levada ao fogo até fervura e submetida ao vácuo para retirada das bolhas. A solução foi derramada sobre uma placa de vidro com um espaçador de acrílico de 6mm de altura e coberta com uma segunda placa de vidro. Após ser resfriado à temperatura ambiente (aproximadamente 5 min), o gel foi levado à geladeira por aproximadamente 20 min para atingir temperatura e consistência ideais para corrida.

O gel foi cortado a uma distância de aproximadamente 3cm de sua borda inferior, resultando em duas partes desiguais. Os papéis de filtro embebidos no homogeneizado foram colocados ordenadamente no gel (na parte maior). O gel foi, então, remontado. Uma gota de solução de azul de bromofenol foi adicionada em cada lateral do gel para servir como marcador de *front* de corrida. O gel foi, então, colocado em uma cuba de eletroforese horizontal para a corrida eletroforética.

3.2.4. Corrida eletroforética

As corridas eletroforéticas foram realizadas com as cubas dentro de uma geladeira, à temperatura média de 5⁰C, a uma potência média de 3,2 W e um período médio de 7 horas.

Após a corrida, o gel foi fatiado numa mesa de corte fixa na qual existe um fio de aço inoxidável muito fino disposto em diagonal. As fatias foram de aproximadamente 1mm de espessura, portanto, para cada gel foi possível obter 5 ou 6 fatias. Destas, as duas fatias externas eram descartadas devido a produzirem uma má resolução das enzimas.

3.2.5. Revelação

As fatias de gel foram colocadas em placas de acrílico e, posteriormente, adicionadas soluções reveladoras apropriadas para cada enzima, conforme HARRIS & HOPKINSON (1978) e RICHARDSON *et al.*, (1986). As soluções reveladoras consistiram de um tampão com pH próximo do que é considerado ideal para a enzima, onde foram dissolvidos o substrato da enzima, seus cofatores e substâncias capazes de detectar a reação ou formação do produto. Nas Tabelas 3 e 4 estão as receitas dos tampões reveladores e das enzimas usadas neste trabalho, respectivamente.

Tabela 3: Receitas dos sistemas de tampão usados para revelação (HARRIS & HOPKINSON, 1978; RICHARDSON *et al.*, 1986).

Tampão	Ph	Receita
TRIS Maleato 0,02M	5,3	Água destilada 1,0 L TRIZMA base 1,2 g Ácido maleico 2,3 g
TRIS HCl	8,0	Água destilada 1,0 L TRIS HCl 2,4 g

Tabela 4: Receitas dos sistemas enzimáticos revelados (HARRIS & HOPKINSON, 1978; RICHARDSON *et al.*, 1986).

Enzima	Receita	Tampão de revelação
<i>a-Est</i>	<i>a</i> -naphthyl acetate 10mg* Fast blue 20mg	Tris Maleato
<i>β-Est</i>	<i>β</i> -naphthyl acetate 10mg** Fast blue 20mg	Tris Maleato
<i>G6pd</i>	NADP 5mg MTT 5mg PMS 1mg $MgCl_2$ 10mg Glucose 6-Phosphate 50 mg	Tris-HCl
<i>Ldh</i>	NAD 15mg MTT 7mg PMS 1mg Lactate 100mg	Tris-HCl
<i>Mdh</i>	NAD 8mg MTT 5mg PMS 1mg Malate 50mg	Tris HCl
<i>Me</i>	NADP 8mg MTT 5mg PMS 1mg $MgCl_2$ Malate 50mg	Tris-HCl
<i>Odh</i>	NAD 15mg MTT 7mg PMS 1mg Octanol 1ml	Tris-HCl
<i>Pgi</i>	NADP 3mg MTT 5mg PMS 1mg $MgCl_2$ 25mg G6PDH 1,4u Fructose-6-phosphate 25mg	Tris HCl
<i>Pgm</i>	NADP 5mg MTT 5mg PMS 1mg $MgCl_2$ 50mg G6PDH 25mg Glucose-1-phosphate 50mg	Tris HCl
<i>Sod</i>	MTT 7mg PMS 1mg	Tris HCl
<i>Sordh</i>	Sorbitol 75mg NAD 7mg MTT 4mg PMS 1mg Sodium pyruvate 30 mg Pyrazole 30 mg	Tris-HCl
<i>Xod</i>	MTT 5mg PMS 1mg Hypoxantine 15mg	Tris HCl

* dissolvido em 0,5mL de EtOH

** dissolvido em 0,5mL de acetona

3.2.6. Interpretação dos géis

Os padrões de bandas resultantes da revelação foram interpretados de forma mendeliana, de maneira conservadora, seguindo os padrões já encontrados para enzimas mono, di, e tetraméricas (HARRIS & HOPKINSON, 1978; RICHARDSON *et al.*, 1986). Os alelos foram classificados de acordo com sua mobilidade anódica. O alelo mais rápido de cada *locus* foi designado “a”, o segundo “b”, e assim por diante. Esta interpretação foi desenhada em papel pautado. A obtenção das frequências genotípicas observadas foi obtida através da contagem direta dos genótipos nas interpretações desenhadas no papel. A Figura 3 representa as etapas do método de eletroforese de aloenzimas.

3.2.7. Fixação dos géis

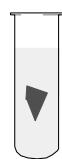
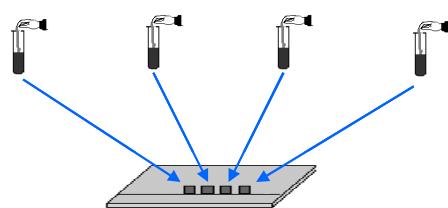
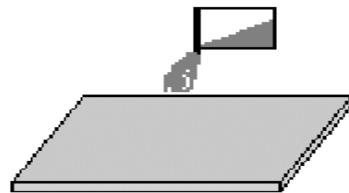
Após a interpretação, os géis foram colocados por 24 horas em uma solução fixadora de ácido acético a 7% para as enzimas desidrogenases (*G6pd*, *Ldh*, *Mdh*, *Me*, *Odh*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod*, *Sordh* e *Xod*) e uma solução de 5 partes de metanol, 5 partes de água destilada e 1 de ácido acético (5:5:1) no caso das outras enzimas (α -*Est* e β -*Est*). Em seguida, foram mergulhados por mais 24 horas em solução de glicerol 5%, etiquetados (nome da enzima, número do gel, tampão e data da eletroforese) e montados entre duas folhas de celofane embebidas na mesma solução de glicerol e deixados para secar por alguns dias a temperatura ambiente, sendo posteriormente arquivados.

1) POPULAÇÃO NATURAL**2) INDIVÍDUO**

Dourado



Palombeta

**3) AMOSTRA DE TECIDO DO INDIVÍDUO****5) GEL DE AMIDO COM AMOSTRAS DE HOMOGENEIZADO DE CADA INDIVÍDUO DA POPULAÇÃO****7) COLORAÇÃO ESPECÍFICA DAS ALOENZIMAS****2) INDIVÍDUO**

Dourado



Palombeta

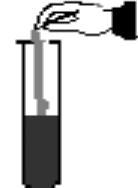
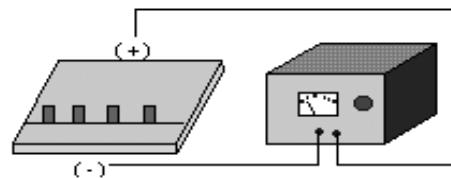
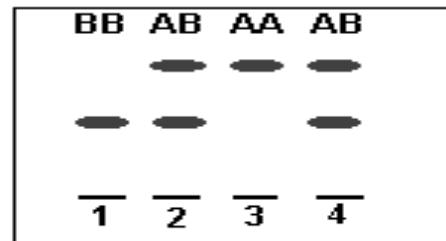
**4) HOMOGENEIZADO****6) ELETROFORESE****8) INTERPRETAÇÃO MENDELIANA DAS BANDAS NO GEL**

Figura 3: Resumo do método de eletroforese de aloenzimas (adaptado de SILVA, 2009).

3.3. Análise de dados

As frequências genotípicas observadas, interpretadas diretamente dos géis, encontram-se no Anexo C desta monografia. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os programas *GENEPOP* 4.2 (ROUSSET, 2008) *BIOSYS-2* (SWOFFORD & SELANDER, 1997), *Fstat* 2.9.3.2. (GOUDET, 2001), *PAST* 2.08 (HAMMER *et al.*, 2001) e o *Excel* para *Windows*.

Os genótipos interpretados a partir dos géis foram usados para gerar as frequências gênicas de cada *locus* em cada população através da seguinte fórmula:

$$\text{Frequência (A)} = [(AA) + (AB)/2]/N$$

Onde:

AA e **AB** = contagem direta do número de indivíduos que apresentavam os genótipos homozigotos e heterozigotos presentes na amostra e,

N = tamanho da amostra.

Em populações diplóides, a distribuição dos genes em cada *locus* é governada pela lei de Hardy-Weinberg, obedecidos seus pressupostos. De acordo com essa lei, as frequências genotípicas são dadas pela soma dos quadrados das frequências alélicas. Assim, em um *locus* enzimático com dois alelos (A e B) e dadas as suas frequências (p e q, respectivamente), as frequências dos três genótipos correspondentes serão dadas pela seguinte equação:

$$(p + q)^2 = 1$$
$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

A comparação entre proporções genotípicas observadas com aquelas esperadas pela lei de Hardy-Weinberg é um procedimento fundamental em genética de populações. O teste do qui-quadrado é o mais comumente utilizado para testar a hipótese de diferenças significativas entre as proporções observadas e esperadas:

$$\chi^2 = \Sigma((o - e)^2/e)$$

Onde:

o = proporção genotípica observada e,

e = proporção genotípica esperada.

Para os testes de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi usado um teste exato (ROUSSET & RAYMOND, 1995), no qual a hipótese nula foi de união ao acaso de gametas e, a hipótese alternativa, o déficit de heterozigotos. A significância dos valores de P obtidos foram corrigidos com a técnica de Bonferroni (RICE, 1989):

$$P = \alpha/k$$

Onde:

α = nível de significância e,

k = número de testes realizados.

A heterozigosidade foi calculada de acordo com a fórmula:

$$H = \Sigma(h/r)$$

Onde:

r = número de *loci* e,

h = índice de diversidade gênica:

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

Onde:

p = a frequência do alelo i do gene nesse *locus*.

O grau de polimorfismo corresponde ao número de *loci* polimórficos dividido pelo número total de *loci* analisados. Um *locus* foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado.

Para testar a hipótese de que os genótipos de cada *locus* são independentes com relação aos outros *loci*, ou seja, de que não há desequilíbrio de ligação entre os *loci*, foi utilizado o teste exato de Fisher (SOKAL & ROHLF, 1997).

A hipótese nula (H_0) de trabalhos clássicos de sistemática molecular com aloenzimas (THORPE & SOLÉ-CAVA, 1994; WIENS, 1999) é sempre a mais parcimoniosa (BAKER, 2007), isso é, a de que as amostras comparadas são sempre homogêneas. A hipótese alternativa de trabalhos desta natureza (H_1), por sua vez, é a de que as amostras são heterogêneas e formam grupos distintos. No caso deste estudo, se os resultados apresentarem uma relação maior com H_1 em comparação a H_0 , os morfotipos de *C. hippurus* podem ser considerados populações pertencentes à espécies

diferentes. Caso contrário, eles podem ser considerados populações da mesma espécie. Para verificar estas hipóteses, foram feitas alguns testes e relações, os quais estão descritos a seguir.

A fim de medir o grau de diferenciação gênica entre as populações, foram empregados os índices de fixação de Weir & Cockerham (1984), F , f e θ . F é o índice de endocruzamento total e inclui tanto a contribuição devido ao cruzamento não panmítico dentro de cada subpopulação (f) como o efeito da subdivisão em subpopulações (θ). O cálculo da significância dos índices de fixação de Weir & Cockerham (1984) foi feito por *bootstrap* entre os *loci* com intervalos de confiança de 95% e 99%.

A partir dos valores de θ , foi possível obter uma estimativa do fluxo gênico entre os grupos (*dourado* e *palombeta*), que é o número médio de migrantes ($N_e m$) trocados entre populações a cada geração, da seguinte forma:

$$N_e m = [(1/\theta) - 1]/4$$

O cálculo das identidades gênicas (I) foi realizado a partir das frequências gênicas, utilizando-se o índice de Nei (1972):

$$I = \Sigma (f_i \times f_j) / (f_i^2 \times f_j^2)^{0,5}$$

Onde:

f_i = frequência de cada alelo na população i , e;

f_j = frequência de cada alelo na população j

Desta forma, estima-se o grau de similaridade genética entre as populações em relação às suas frequências alélicas.

Foi testada a hipótese de existirem diferenças significativas entre as heterozigozidades observadas e esperadas e entre o número efetivo de alelos para cada morfotipo, com o intuito de analisar se a discrepância destes valores entre os grupos estudados era significativa. Para isso, o Teste U de Mann-Whitney foi executado por meio do software *PAST 2.08* (HAMMER *et al.*, 2001). Este teste é utilizado para a comparação de grupos independentes e sua hipótese nula estipula que estes grupos são homogêneos se eles representarem distribuição cumulativa contínua. Para isso, foram comparados os valores de heterozigosidade observada e esperada entre os dois grupos, bem como o número efetivo de alelos (calculado com o uso do *Excel*).

O valor de número efetivo de alelos (A_e) para cada *locus* foi obtido a partir das frequências dos alelos, utilizando-se a equação sugerida por Kimura e Crow (1964):

$$A_e = 1/\sum f_i^2$$

Onde:

f_i = frequência de cada alelo na população

Os dados de peso total (em gramas), peso das gônadas (em gramas), sexo, comprimento total (em centímetros), gradação comercial, embarcação e estoque pesqueiro, juntamente com os genótipos de 6 *loci* (α -*Est-1*, α -*Est-2*, *Ldh*, *Mdh-3*, *Odh-1* e *Xod*) para 10 indivíduos (6 *dourados* e 4 *palombetas*, indicados nos Anexos A e B) foram tabelados no *Excel*, logaritimizados e exportados para o *PAST 2.08*, no qual foi realizada uma análise de componente principal (PCA), a fim explorar a possibilidade de relação entre os dados. Para tanto, foram selecionados os 10 indivíduos com dados disponíveis para o maior número de *loci* e que apresentaram o maior número disponível de dados biológicos.

Uma PCA consiste na redução das dimensões de uma matriz de dados através da determinação de novas dimensões, os componentes principais. Cada componente é definido como um eixo em um espaço n-dimensional, no qual cada dimensão representa uma variável estimada a partir de um ou mais conjuntos de dados. O primeiro componente estimado é um eixo orientado na direção de maior variação dos dados. O segundo componente é definido como um eixo ortogonal ao primeiro componente e orientado na direção da segunda maior variação dos dados e assim sucessivamente para os outros eixos (SOKAL & ROHLF, 1997).

A partir da análise multivariada, foi gerado um dendograma pelo método de análise de agrupamento (*cluster analysis*), também com o uso do *PAST 2.08*. Este método consiste num conjunto de técnicas estatísticas cujo objetivo é agrupar componentes segundo suas características, formando grupos ou conglomerados homogêneos de acordo com um determinado algoritmo (HAIR *et al.*, 1998). Na análise realizada neste trabalho, o algoritmo utilizado foi a distância de Mahalanobis (MAHALANOBIS, 1936). Este algoritmo se baseia na correlação entre as variáveis para determinar a similaridade entre diferentes componentes. Isso é feito considerando não somente a medida de tendência central como também a variabilidade dentro de cada unidade amostral, favorecendo a manutenção da homogeneidade dentro dos grupos

formados e a heterogeneidade entre estes grupos (SARTORIO, 2008). Por estas características, esta medida é indicada para demonstrar que unidades amostrais podem constituir um ou mais conjunto de (neste caso) indivíduos (RIBOLDI, 1986).

4. RESULTADOS

Os doze sistemas enzimáticos analisados foram interpretados como dezenove *loci* gênicos, todos polimórficos, à exceção da enzima *Sod*, para ambos os morfotipos e *Mdh-1* para o morfotipo *palombeta*. As enzimas α -*Est* e β -*Est* apresentaram três *loci* gênicos cada uma, enquanto as enzimas *Mdh*, *Me* e *Odh* apresentaram dois *loci* gênicos cada. Todas as outras enzimas apresentaram apenas um *locus*. A Tabela 5 apresenta os resultados de frequências gênicas para todos os *loci* nos dois morfotipos estudados, bem como os respectivos tamanhos de amostra utilizados. É possível observar que o *locus* *Pgm* é o mais polimórfico, apresentando cinco alelos, seguido por *Pgi*, com quatro alelos. Os *loci* *Ldh* e *Mdh-1* são praticamente monomórficos para ambos os morfotipos, pois mesmo no caso de *Ldh* para *palombeta*, que apresenta quatro alelos, o alelo A se apresenta com frequência próxima a 0,9. Alguns alelos estão presentes para um morfotipo, mas não em outro. Foi o caso de α -*Est-1*, β -*Est-3*, *Me-2*, *Odh-1* e *Odh-2* (2 alelos em *dourado* e 3 alelos em *palombeta*), *G6pd* (2 alelos em *dourado* e 4 alelos em *palombeta*) e α -*Est-3* (4 alelos em *dourado* e 3 alelos em *palombeta*). No entanto, nenhum *loci* se apresentou como diagnóstico entre os morfotipos.

Os resultados das tabelas de contingência (Anexo D) evidenciaram que existe diferença significativa entre as frequências alélicas dos morfotipos em dois dos dezoito *loci* testados (α -*Est-3* e β -*Est-1*), quantidade maior do que é esperada ao acaso para a quantidade de testes realizados (seria esperado encontrar desvio significativo para apenas 1 *locus*).

A maioria dos *loci* não desviou significativamente do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni. Contudo, foram encontrados quatro desvios significativos (mais do que o esperado ao acaso que seria de 1,8 *loci*): um para o *locus* β -*Est-2* do morfotipo *dourado*, outro para o *locus* α -*Est-2* do morfotipo *palombeta* e outros dois para o *locus* *Odh-1* em ambos os morfotipos (Tabela 6).

Não foi encontrado nenhum caso de desequilíbrio de ligação entre nenhum dos *loci* para nenhum dos morfotipos estudados. Estes resultados encontram-se no Anexo E.

Para um tamanho médio de amostra de 17,95 indivíduos (15,3 para *dourado* e 20,6 para *palombeta*), a média de alelos por *locus* para os dois morfotipos foi de 2,82, sendo de 2,63 para *dourado* e 3,00 para *palombeta*. O polimorfismo médio foi de 92,11%, sendo que o morfotipo *palombeta* apresentou o polimorfismo mais baixo (89,47%) e o morfotipo *dourado* apresentou o maior polimorfismo (94,74%). As heterozigosidades observadas variaram de 0,264 (*dourado*) a 0,342 (*palombeta*), com

média para os morfotipos de 0,303. As heterozigosidades esperadas tiveram valores que variaram entre 0,367 (*dourado*) e 0,469 (*palombeta*) com média para todas as populações de 0,418 (Tabela 7). A maior heterozigosidade por *locus* encontrada em *dourado* foi para a enzima *Pgi* ($H_{obs} = 0,647$ e $H_{esp} = 0,643$), e em *palombeta* foi para a enzima β -*Est-3* ($H_{obs} = 1,0000$ e $H_{esp} = 0,733$) (Tabela 8).

Nos testes de Mann-Whitney, os desvios encontrados para as comparações entre as heterozigosidades observadas e esperadas dos morfotipos foram significativos ($P = 0,0001$), bem como para a comparação entre o número efetivo de alelos dos morfotipos ($P = 0,0083$).

O θ médio para todos os morfotipos foi 0,075, que não difere significativamente de zero. A variação dos θ oscilou entre -0,108 (*Mdh-1*) até 0,263 (β -*Est-3*), sendo significativamente diferente de zero em oito *loci* (β -*Est-1*; β -*Est-3*; *Mdh-1*; *Me-1*; *Me-2*; *Odh-1*; *Pgi*; *Pgm* e *Sordh*). O f médio para todas as populações foi, também, não significativo (0,237), tendo seus valores variando entre -0,330 (β -*Est-3*) e 0,759 (*Odh-1*). O valor médio de F foi 0,295, também não significativo, variando entre -0,121 (*Mdh-1*) e 0,749 (*Odh-1*) (Tabela 9).

O número de migrantes por geração estimado entre os morfotipos foi igual a 3,083, enquanto a identidade gênica encontrada entre os morfotipos foi igual a 0,935, os quais representam valores encontrados para populações co-específicas (THORPE, 1983. Ver Figura 4).

A análise de componente principal indicou que 91,08% da variação total pode ser explicada pelos três primeiros componentes (*Odh-1*, α -*Est-2* e peso das gônadas), sendo o primeiro componente (*Odh-1*) responsável por quase metade desta variação (49,32%). A Figura 5 mostra as médias dos coeficientes de correlação para cada variável em relação ao componente principal.

O dendograma gerado pela análise de agrupamento através da distância de Mahalanobis apresenta os indivíduos amostrados em dois grupos distintos: um composto pelos indivíduos do morfotipo *palombeta* e um indivíduo do morfotipo *dourado* (D27) e, o outro, composto por todos os outros indivíduos do morfotipo *dourado* (Figura 6).

Tabela 5: Frequências alélicas (N = tamanho da amostra para cada *locus*)

Locus	Morfotipo		Locus	Morfotipo	
	Dourado	Palombeta		Dourado	Palombeta
<i>α-Est-1</i>			<i>Mdh-3</i>		
A	0,192	0,412	A	0,643	0,321
B	0,808	0,500	B	0,238	0,393
C	0,000	0,088	C	0,071	0,250
N	13	17	D	0,048	0,036
			N	21	28
<i>α-Est-2</i>			<i>Me-1</i>		
A	0,060	0,280	A	0,833	0,889
B	0,840	0,660	B	0,167	0,111
C	0,100	0,060	N	6	9
N	25	25			
<i>α-Est-3</i>			<i>Me-2</i>		
A	0,542	0,294	A	0,438	0,214
B	0,167	0,647	B	0,563	0,571
C	0,250	0,059	C	0,000	0,214
D	0,042	0,000	N	8	7
N	12	17			
<i>β-Est-1</i>			<i>Odh-1</i>		
A	0,079	0,515	A	0,594	0,581
B	0,842	0,439	B	0,409	0,371
C	0,079	0,045	C	0,000	0,048
N	19	33	N	16	31
<i>β-Est-2</i>			<i>Odh-2</i>		
A	0,156	0,406	A	0,864	0,947
B	0,781	0,531	B	0,136	0,026
C	0,063	0,063	C	0,000	0,026
N	16	16	N	11	19
<i>β-Est-3</i>			<i>Pgi</i>		
A	0,833	0,300	A	0,441	0,569
B	0,167	0,300	B	0,412	0,276
C	0,00	0,400	C	0,088	0,121
N	3	5	D	0,059	0,034
			N	17	29
<i>G6pd</i>			<i>Pgm</i>		
A	0,750	0,341	A	0,705	0,722
B	0,250	0,341	B	0,136	0,130
C	0,000	0,250	C	0,091	0,019
D	0,000	0,068	D	0,045	0,037
N	4	22	E	0,023	0,093
			N	22	27
<i>Ldh</i>			<i>Sod</i>		
A	0,966	0,867	A	1,000	1,000
B	0,034	0,078	N	32	37
C	0,000	0,011	<i>Sordh</i>		
D	0,000	0,044	A	0,250	0,500
N	29	45	B	0,750	0,500
			N	6	2
<i>Mdh-1</i>			<i>Xod</i>		
A	0,923	1,000	A	0,194	0,286
B	0,077	0,000	B	0,722	0,500
N	13	2	C	0,083	0,214
			N	18	21

Tabela 6: Probabilidades (P) de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_0 : união de gametas ao acaso).

<i>Locus</i>	<i>Morfótipo</i>	
	Dourado	Palombeta
<i>a-Est-1</i>	1,0000	0,0214
<i>a-Est-2</i>	0,1261	0,0002*
<i>a-Est-3</i>	0,0376	0,0144
<i>β-Est-1</i>	0,0206	0,0077
<i>β-Est-2</i>	0,0006*	0,8136
<i>β-Est-3</i>	-	1,0000
<i>G6pd</i>	0,1429	0,3627
<i>Ldh</i>	1,0000	1,0000
<i>Mdh-1</i>	1,0000	-
<i>Mdh-3</i>	0,1826	0,0182
<i>Me-1</i>	0,0909	1,0000
<i>Me-2</i>	0,5301	0,5152
<i>Odh-1</i>	0,0005*	0,0000*
<i>Odh-2</i>	1,0000	1,0000
<i>Pgi</i>	1,0000	0,0581
<i>Pgm</i>	0,0124	0,0019
<i>Sod</i>	-	-
<i>Sordh</i>	1,0000	0,3333
<i>Xod</i>	0,4124	0,4197

* Significativo após correção de Bonferroni ($\alpha=0,001428$)**Tabela 7:** Tamanho médio de amostra, número médio de alelos por *locus*, grau (%) de polimorfismo e heterozigosidades médias observadas e esperadas (Desvios-padrão entre parêntesis).

Morfótipo	Tamanho médio de amostra	Nº médio de alelos	% de loci polimórficos*	Heterozigosidade média	
				Observada	Esperada**
Dourado	15,3 ($\pm 1,9$)	2,63 ($\pm 0,23$)	94,74	0,264 ($\pm 0,046$)	0,367 ($\pm 0,040$)
Palombeta	20,6 ($\pm 2,8$)	3,00 ($\pm 0,23$)	89,47	0,342 ($\pm 0,061$)	0,469 ($\pm 0,055$)
Média para todas as pops	17,95	2,82	92,11	0,303	0,418

* Um *locus* foi considerado polimórfico quando mais de um alelo foi detectado

** Estimativa não-viciada (NEI,1978)

Tabela 8: Heterozigosidades por *locus* (H_{obs} = heterozigozidade observada; H_{esp} = heterozigozidade esperada).

Morfotipo	α -Est-1		α -Est-2		α -Est-3		β -Est-1		β -Est-2		β -Est-3		<i>G6pd</i>		<i>Ldh</i>	
	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}
Dourado	0,385	0,323	0,240	0,287	0,583	0,641	0,158	0,286	0,063	0,373	0,333	0,333	0,000	0,429	0,069	0,068
Palombeta	0,294	0,590	0,200	0,492	0,235	0,506	0,303	0,548	0,500	0,567	1,000	0,733	0,545	0,717	0,267	0,243
Morfotipo	<i>Mdh-1</i>		<i>Mdh-3</i>		<i>Me-1</i>		<i>Me-2</i>		<i>Odh-1</i>		<i>Odh-2</i>		<i>Pgi</i>		<i>Pgm</i>	
	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}
Dourado	0,154	0,148	0,381	0,535	0,000	0,303	0,375	0,525	0,063	0,498	0,273	0,247	0,647	0,643	0,409	0,485
Palombeta	0,000	0,000	0,492	0,691	0,222	0,209	0,571	0,626	0,161	0,531	0,105	0,104	0,759	0,595	0,333	0,460
Morfotipo	<i>Sod</i>		<i>Sordh</i>		<i>Xod</i>											
	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}	H_{obs}	H_{esp}										
Dourado	0,000	0,000	0,500	0,409	0,389	0,446										
Palombeta	0,000	0,000	0,000	0,667	0,571	0,638										

Tabela 9: Índices de endocruzamento de Weir & Cockerham (1984) com os intervalos de confiança para as médias por Bootstrap.

Locus	F	θ	f
<i>a-Est-1</i>	0,376 ns	0,101 ns	0,306 ns
<i>a-Est-2</i>	0,480**	0,071 ns	0,440**
<i>a-Est-3</i>	-0,076 **	0,118 ns	-0,220**
<i>β-Est-1</i>	0,597**	0,263**	0,453**
<i>β-Est-2</i>	0,457**	0,080 ns	0,409**
<i>β-Est-3</i>	-0,007 **	0,243**	-0,330
<i>G6pd</i>	0,376 ns	0,073 ns	0,327 ns
<i>Ldh</i>	-0,055 **	0,026 ns	-0,083**
<i>Mdh-1</i>	-0,121 **	-0,108**	-0,012**
<i>Mdh-3</i>	0,409 ns	0,090 ns	0,351 ns
<i>Me-1</i>	0,424*	-0,099**	0,477**
<i>Me-2</i>	0,198 ns	0,003**	0,196 ns
<i>Odh-1</i>	0,749**	-0,040**	0,759**
<i>Odh-2</i>	-0,042 **	0,030 ns	-0,074**
<i>Pgi</i>	-0,163 **	0,011**	-0,176**
<i>Pgm</i>	0,213 ns	-0,014**	0,224 ns
<i>Sod</i>	-	-	-
<i>Sordh</i>	0,156*	-0,078**	0,217 ns
<i>Xod</i>	0,149*	0,038 ns	0,116 ns
<i>Todos</i>	0,295 ns	0,075 ns	0,237 ns
<i>Intervalo de confiança (95%)</i>	[0,173; 0,409]	[0,023; 0,125]	[0,104; 0,363]
<i>Intervalo de confiança (99%)</i>	[0,133; 0,442]	[0,008; 0,141]	[0,058; 0,398]

ns = não significativo; * = significativo (95%); ** = significativo (99%)

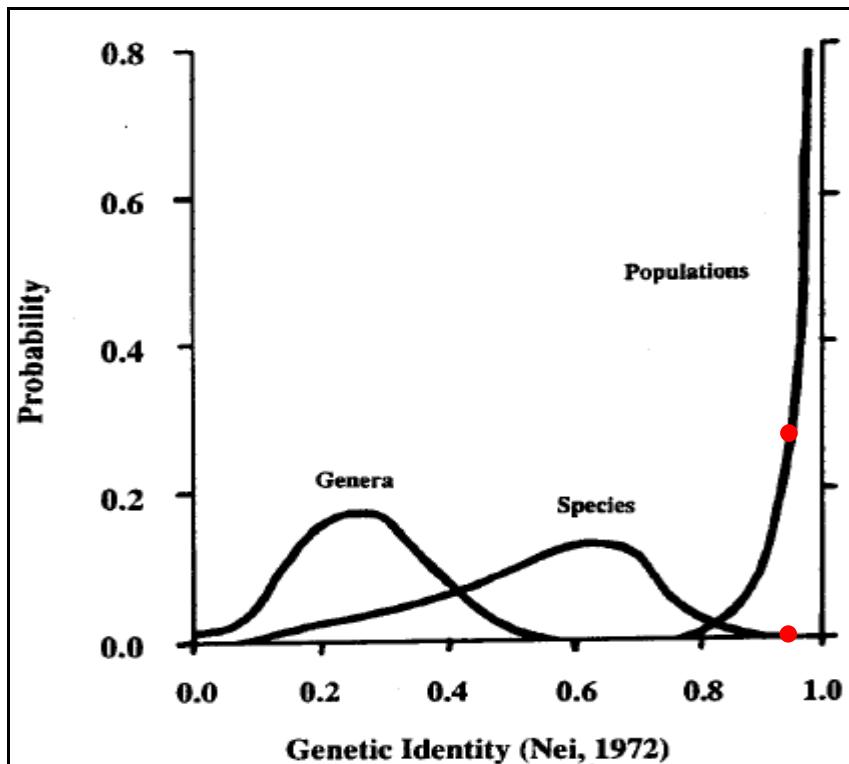


Figura 4: Diagrama extraído de Thorpe (1983), demonstrando as probabilidades dos valores de identidade gênica (NEI, 1972) associados a populações da mesma espécie, espécies do mesmo gênero e espécies de diferentes gêneros. Os pontos em vermelho apontam as probabilidades associadas a identidade gênica encontrada entre os morfotipos estudados neste trabalho ($I = 0,935$).

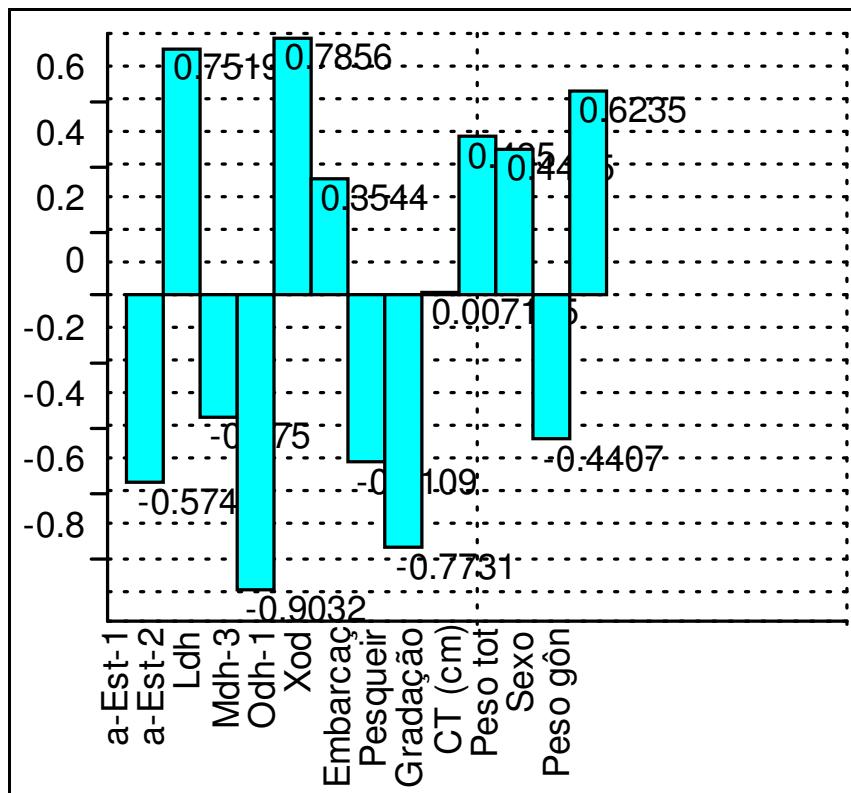


Figura 5: Valores médios dos coeficientes de correlação entre cada variável e o primeiro componente principal para a PCA realizada.

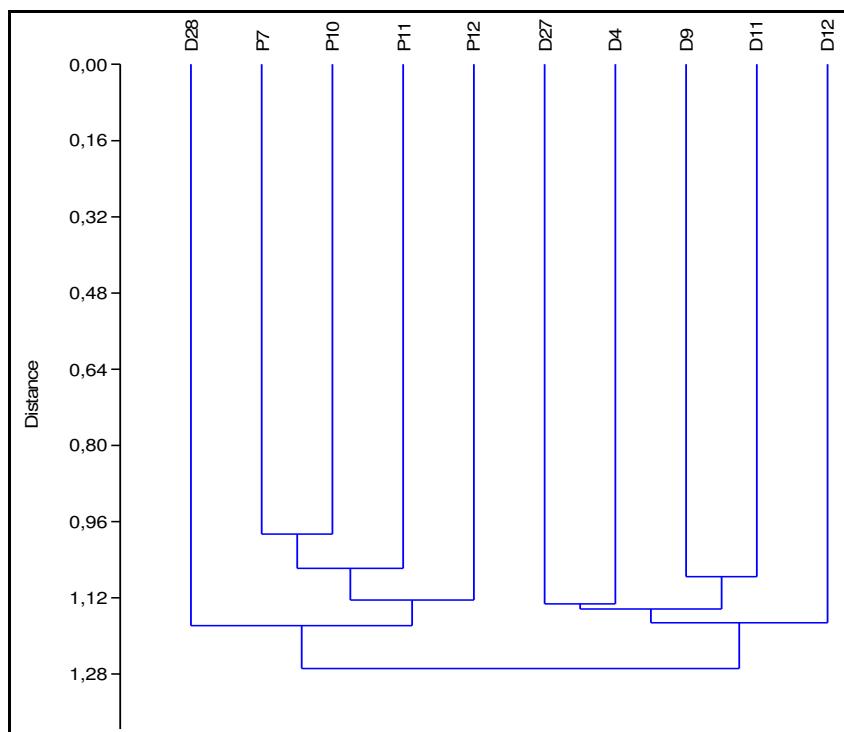


Figura 6: Dendograma gerado pela análise de aglomerados através da distância de Mahalanobis com os indivíduos analisados na PCA. Onde: D- dourado e P- palombeta.

5. DISCUSSÃO

Analizando os dados obtidos sob a luz da pergunta lançada neste trabalho (Os morfotipos de *C. hippurus* analisados são de espécies diferentes?), foi possível obter algumas respostas e uma hipótese *a posteriori*. Primeiramente, não foi encontrado, entre os *loci* analisados, nenhum que fosse diagnóstico entre os morfotipos. Ao analisar a variação gênica de diferentes amostras do gênero *Coryphaena* capturadas nas Ilhas Canárias por meio de eletroforese de aloenzimas, Pujolar & Pla (2002) reconheceram 11 *loci* diagnósticos e a ocorrência de duas espécies de *Coryphaena* naquele local (*C. hippurus* e *C. equiselis*). Logo, era esperado que, se os morfotipos aqui analisados fossem espécies diferentes, um ou mais *locus* diagnósticos fossem encontrados entre aqueles analisados, o que não foi o caso. Outros trabalhos de investigação do *status* taxonômico de diferentes populações ou morfotipos de peixes encontram *locus* diagnóstico, o que reforça esta expectativa (ASHBAUGH *et al.*, 1994; LACSON, 1994; ARCULEO *et al.*, 1999; ZAWADZKI *et al.*, 2004). Desta forma, a ausência deste tipo de *locus* favorece a hipótese de que os grupos analisados são da mesma espécie (GRAVES & ROSENBLATT, 1980; KRAMER *et al.*, 2003; VAN DER BANK *et al.*, 2009).

Além da inexistência de *locus* diagnóstico, o valor de identidade gênica (I) encontrado entre os morfotipos (0,935) equivale ao que é, geralmente, encontrado para populações co-específicas de acordo com Thorpe (1983). Trabalhos medindo a identidade gênica entre grupos de peixes utilizando a eletroforese de aloenzimas como método costumam associar valores de I acima de 0,85 a populações de mesma espécie (MACHORDOM *et al.*, 1999; CORDES *et al.*, 2005; ERDOĞAN *et al.*, 2009), assim como foi encontrado para *dourado* e *palombeta* no presente trabalho.

Outro dado que favorece a hipótese nula é o número de migrantes por geração encontrado entre os morfotipos (3,083). Alguns autores (WRIGHT, 1931; SLATKIN, 1985; MILLS & ALLENDORF, 1996) apontam que apenas um migrante por geração pode ser o suficiente para conservar a homogeneidade entre conjuntos gênicos e impedir a diferenciação geográfica. Isto é observado em alguns trabalhos com peixes tendo a eletroforese de aloenzimas como método de amostragem da variação gênica (LACSON, 1992; GEERTJES *et al.*, 2004) e parece ser o caso dos morfotipos analisados aqui.

Os valores médios para os índices de endocruzamento (f , θ e F) encontrados não foram significativos, o que indica ausência de cruzamentos preferenciais dentro dos morfotipos (WAPLES, 1998). Um padrão semelhante a esse é observado em outros trabalhos com peixes tendo a eletroforese de aloenzimas como método de amostragem

da variação (WAPLES, 1986), indicando, em todos os casos, uma homogeneidade dos grupos envolvidos, como parece ser o caso neste trabalho.

Os dados de heterozigozidade esperada e observada e o grau de polimorfismo encontrado para *dourado* e *palombeta* podem ser considerados altos em relação ao que geralmente é amostrado em peixes (WARD *et al.*, 1992). Mais que isso, Pla & Pujolar (1999) analisando a variação gênica de 735 espécimes jovens de *C. hippurus* de seis localidades do mar Mediterrâneo e do oceano Atlântico por meio de eletroforese de aloenzimas, observaram uma baixa heterozigozidade (média de 0,0425 para as seis populações amostradas) e um baixo polimorfismo (23,333% dos *locus* das seis populações) para estas populações. A diferença entre os níveis de variação gênica encontrados no presente trabalho em relação ao de Pla & Pujolar (1999) pode ser explicada pelos *loci* que foram amostrados. Sabe-se que algumas aloenzimas podem apresentar um maior polimorfismo em relação a outras (WARD *et al.*, 1992). Naquele trabalho, dos trinta *loci* amostrados, vinte e dois deles se apresentaram monomórficos, enquanto neste apenas dois dos dezenove *loci* amostrados apresentaram apenas um alelo, sendo que os dois trabalhos amostraram apenas 3 sistemas enzimáticos em comum (*Ldh*, *Mdh* e *Sod*). Isso, possivelmente, indica que os *loci* aqui amostrados apresentam um maior polimorfismo, o que pode explicar a diferença na quantidade de variação encontrada para os dois trabalhos.

Foram detectados quatro *loci* que desviaram significativamente do esperado pela hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo dois deles para o mesmo *locus* nos dois morfotipos (*Odh-1*). Do mesmo modo, foram encontradas diferenças significativas de heterozigozidade (tanto esperada, quanto observada) e número efetivo de alelos entre os grupos. Assim, uma hipótese *a posteriori* surge: a de que os polimorfismos observados dentro de cada grupo e entre eles não estariam sendo mantidos de acordo com o que propõe modelo neutralista de equilíbrio entre taxa de mutação e deriva genética (KIMURA, 1968; KIMURA & OHTA, 1971; NEI, 1975), e sim de acordo com o modelo selecionista (CLARKE, 1975; NEVO, 1975; NEVO *et al.*, 1986), principalmente pela atuação de seleção natural sobre o *locus Odh-1*.

O modelo neutralista, considerado a hipótese nula para explicar a ocorrência de altos níveis de heterozigozidade em populações naturais, sugere que a variação gênica entra nas populações por mutação e se perde por força de deriva gênica (NEI, 2005). Para este modelo, a perda de variação ocorre mais lentamente em populações grandes, pelo fato da deriva estar associada ao tamanho efetivo das populações (OHTA, 1992). O

modelo selecionista, por sua vez, propõe que os polimorfismos presentes nas populações naturais são mantidos por seleção natural diversificadora, isto é, qualquer tipo de seleção natural que mantenha altos os níveis de variação gênica nas populações (NEVO, 1983).

Hipóteses envolvendo a ação de seleção natural sobre as frequências gênicas de um ou mais *locus* dependem de que o *locus* alvo de seleção tenha correlação com algum fator ambiental (SILVA, 2009), o que pode ser o caso da *Odh* (também citada na literatura como *Adh*, N° E.C. 1.1.1.1, *alcohol NAD + oxidoreductase*). Esta enzima participa de uma das vias do piruvato, catalisando a sua redução ao etanol (ao invés de lactato) quando da ausência de oxigênio. Este processo evita o acúmulo do lactato no organismo durante o metabolismo em anaerobiose (SHOUBRIDGE & HOCHACHKA, 1980). Esta via de transformação do piruvato em etanol é encontrada nos músculos natatórios de alguns peixes de ambientes pobres em O₂, como *Carassius carassius* e *Carassius auratus* (VORNANEN *et al.*, 2009). A maioria dos vertebrados, incluindo peixes, depende quase exclusivamente do metabolismo aeróbico. Apenas durante períodos de aumento da atividade física ou na baixa dos níveis ambientais de oxigênio ocorre a mudança para vias anaeróbias (TORRES *et al.*, 2012). O atum, por exemplo, parece possuir mecanismos muito bem adaptados para situações de anaerobiose, os quais são usados durante a explosão da natação (HOCHACHKA, 1980).

As diferenças detectadas na enzima *Odh* entre *dourado* e *palombeta* podem estar relacionadas com o metabolismo de natação explosiva, possivelmente associada ao comportamento de fuga. Os indivíduos do morfotípico *palombeta* apresentam um menor porte (menor média de peso e menor tamanho em comprimento), bem como gônadas menos desenvolvidas (menor peso em relação a *dourado*) e estágios de maturação menos avançados do que os indivíduos do morfotípico *dourado*. Isso permite assumir que *palombeta* pode ser um estágio jovem de *dourado* que, possivelmente, é o estágio adulto de *C. hippurus*. Desta forma, as diferenças nas frequências alélicas e na quantidade de alelos para a *Odh* entre os morfotípicos podem ser explicadas por uma mortalidade diferencial entre os grupos. A seleção natural poderia estar agindo sobre a variação em *Odh* de *palombeta*, selecionando aqueles alelos com maior eficiência na conversão do piruvato em etanol ao invés de lactato nos músculos natatórios, impedindo o acúmulo deste composto e resultando na diminuição da variação presente para este *locus* (de 3 alelos em *palombeta* para dois em *dourado* nos dois *loci* de *Odh* amostrados).

Os dados obtidos na análise de componente principal corroboram com este cenário. Foi visto que o primeiro e o segundo componentes principais foram, respectivamente, *Odh-1* e o peso das gônadas, que explicam quase 75% da diferença observada entre os grupos. Este tipo de análise apresenta, geralmente, variáveis como tamanho e peso dos indivíduos como primeiros componentes principais (RISING & SOMERS, 1989; OOSTERMEIJER *et al.*, 1994; GRAVES, 2009) o que não foi o caso para *dourado* e *palombeta*. Este resultado pode estar indicando que a diferença entre os morfotipos está relacionada à pressão de seleção natural (sobre *Odh-1*) nos diferentes estágios de vida da espécie *C. hippurus*. A análise de *cluster* também agrupa *dourados* e *palombetas* em grupos distintos, com a exceção de um “intruso”: o indivíduo *D27*, que foi agrupado juntamente com as *palombetas*. Esta intrusão pode ser explicada justamente pelos genótipos de *Odh-1*. As *palombetas* e o indivíduo *D27* apresentam o mesmo genótipo (AA) para esse *locus*.

Apesar destas evidências, um fator importante aponta contra a hipótese de seleção natural sobre a *Odh*: a inexistência de um desequilíbrio de ligação para este *locus*, um elemento importante para determinar que a seleção natural é a força que está agindo na determinação das diferenças observadas entre os morfotipos (SILVA, 2009). Isso traz à tona o problema epistemológico associado à hipótese de seleção natural: A parcimônia. Hipóteses de seleção natural geralmente assumem muitos pressupostos e demandarem muitos testes para serem aceitas (MCKELVEY & ALDRICH, 1983). Este foi o caso da hipótese aqui sugerida: admitiu-se que os morfotipos são estágios de vida diferentes de uma mesma espécie e que diferentes alelos da enzima (que atua no metabolismo de explosão natatória) gerariam uma mortalidade diferencial entre os morfotipos, o que explicaria as diferenças encontradas entre eles.

A despeito das evidências da ação da seleção natural sobre as amostras aqui analisadas, muitos dos pressupostos assumidos não puderam ser testados neste trabalho, o que inviabiliza a aceitação da hipótese alternativa. A ausência de uma evidência importante como a do desequilíbrio de ligação fragiliza essa alternativa, conduzindo a explicação das diferenças entre os morfotipos para a hipótese nula (o modelo neutralista). Ou seja, a de que, possivelmente, os polimorfismos observados teriam se dado pela ação do acaso.

A contradição Neutralismo x Selecionalismo ainda existe no âmago da teoria evolutiva moderna (SARKAR, 2014) e parece caminhar para uma síntese (WAGNER, 2008), mas as evidências ainda apontam que a maior parte dos polimorfismos nas

aloenzimas das populações naturais é explicada pelo modelo neutralista. Isto não anula a possibilidade de atuação da seleção natural em alguns casos. O próprio modelo neutralista assume que, apesar de rara, a ação de seleção natural pode ser demonstrada, desde que haja um cenário que relate fatores da vida do grupo analisado (ecologia, fisiologia, biologia, comportamento, etc.) com o padrão de variação observado (OHTA & GILLESPIE, 1996) e que todos os pressupostos possam ser testados. Isto foi o que se tentou fazer com a *Odh* em *dourado* e *palombeta*. Contudo, como uma hipótese *a posteriori*, muitas das condições de teste não estavam presentes neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os morfotipos *dourado* e *palombeta* da espécie *Coryphaena hippurus* apresentam alta identidade gênica, valores não significativos dos índices de fixação e número de migrantes por geração maior que um, além de não ter sido encontrado nenhum *locus* diagnóstico entre eles. Desta forma, não é possível rejeitar a hipótese nula deste trabalho de que os grupos analisados pertencem à mesma espécie.

Ambos os morfotipos apresentam altos níveis de variação gênica estimados por número efetivo de alelos, grau de polimorfismo, heterozigozidade observada e esperada. A grande quantidade de variação estimada pode ser explicada pelo comportamento cosmopolita e pelos *habitats* geralmente tropicais desta espécie.

Foram encontradas diferenças significativas de variação gênica entre os morfotipos, *dourado* e *palombeta*, de *Coryphaena hippurus*. A explicação para estes resultados pode estar relacionada à ação de seleção natural direcional sobre o *locus Odh*. Contudo, devido a pouca parcimônia associada às explicações que envolvem a seleção natural, não foi possível aceita-la e preferiu-se a hipótese nula de que as diferenças encontradas se devem a ação do acaso.

Outros marcadores moleculares, mais amostras, diferentes análises voltadas para testar a hipótese de seleção natural e uma maior riqueza de dados ecológicos sobre os morfotipos são necessários para um melhor entendimento das forças evolutivas moldando o padrão de variação gênica revelado neste trabalho para a espécie *Coryphaena hippurus*.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALEIXO, A. 2009. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade* 5(1-2):87-95.
- ARCULEO, M.; MAURO, A.; BRUTTO, S.L.; MITRO, S.; CAMMARATA, M.; MAZZOLA, A. & PARRINELLO, N. 1999. Biochemical genetic differentiation between *Pomatoschistus marmoratus* and *P. tortonesei*. *Journal of Fish Biology* 54:190-195.
- ASHBAUGH, N.A.; ECHELLE, A.A. & ECHELLE, A.F. 1994. Genic diversity in Red River pupfish *Cyprinodon rubrofluviatilis* (Atheriniformes: Cyprinodontidae) and its implications for the conservation genetics of the species. *Journal of Fish Biology* 45:291-302.
- AVISE, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, London.
- AYALA, F.J. & POWELL, J.R. 1972. Allozymes as Diagnostic Characters of Sibling Species of *Drosophila*. *PNAS* 69(5):1094-1096.
- BAKER, A. 2007. Occam's Razor in science: a case study from biogeography. *Biology and Philosophy* 22:195-215.
- BENDER, M.G.; MACHADO, G.R.; SILVA, P.J.A.; FLOETER, S.R.; MONTEIRO-NETO, C.; LUIZ, O.J. & FERREIRA, C.E.L. 2014. Local Ecological Knowledge and Scientific Data Reveal Overexploitation by Multigear Artisanal Fisheries in the Southwestern Atlantic. *PLoS ONE* 9(10):1-9.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K. & DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22(3):148-155.
- BOWLER, P.J. 2003. *Evolution: the history of an idea*. University of California Press, Berkeley.
- CARVALHO, G.R. & HAUSER, L. 1995. Molecular Genetics and the Stock Concept in Fisheries. In: Carvalho, G.R. & Pitcher, T.J. (eds.) *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman & Hall, London, pp. 55-79.
- CHUNG, M.Y. & CHUNG, M.G. 2012. A review of the use of genetic markers in orchid systematics with emphasis on allozymes. *Biochemical Systematics and Ecology* 41:62-73.
- CLARKE, B. 1975. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: Detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. *Genetics* 79:101-113.
- CORDES, J.F.; PERKINS, D.L.; KINCAID, H. L. & MAY, B. 2005. Genetic analysis of fish genomes and populations: allozyme variation within and among Atlantic salmon from Downeast rivers of Maine. *Journal of Fish Biology* 67A:104-117.
- CORTE-REAL, H.B.S.M.; HAWKINS, S.J. & THORPE, J.P. 1993. Genetic confirmation that intertidal and subtidal morphs of *Patella ulyssiponensis aspera* Roding (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) are conspecific. *Arquipelago Life and Earth Sciences* 10:55-66.

- COYNE, J.A. 1994. Ernest Mayr and the origin of species. *Evolution* 48(1):19-30.
- CRICK, F. 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227:561-563.
- CROW, J.F. 1987. Population genetics history: A personal view. *Annual Review of Genetics* 21:1-22.
- DARWIN, C.R. 1859. *The origin of species by means of natural selection*. London, John Murray.
- DÍAZ-JAIMES, P.; URIBE-ALCOCER, M.; ROCHA-OLIVARES, A.; GARCÍA-DE-LEÓN, F.J.; NORTMOON, P. & DURAND, J.D. 2010. Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): the influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57(3):1209-1218.
- EINSTEIN, A. 1915. The Foundation of the General Theory of Relativity. In: Kox, A.J.; Klein, M.J. & Schulmann, R. (eds.) *The collected papers of Albert Einstein*. Princeton University Press, New Jersey, pp. 146-200.
- ENGELS, F. & MARX, K.H. 1848 [2008]. *Manifest der Kommunistischen Partei*. MetaLibri, São Paulo. Disponível em: <http://www.ibiblio.org/ml/libri/e/EngelsFMarxKH_ManifestKommunistischen_p.pdf>. Acesso em: 11/12/2014.
- ERDOĞAN, Z.; TURAN, C. & KOÇ, H.T. 2009. Morphologic and Allozyme Analyses of European anchovy (*Engraulis encrasicolus* (L. 1758)) in the Black, Marmara and Aegean Seas. *Acta Adriatica* 50(1):77-90.
- FERGUSON, A. 1980. *Biochemical Systematics and Evolution*. Blackie Press, Glasgow.
- FIPERJ, 2013. *Diagnóstico da Pesca do Estado do Rio de Janeiro*. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, Niterói.
- FREUD, S. 1920. *A General Introduction to Psychoanalysis*. Boni and Liveright, New York.
- GAY, P. 1989. *Sigmund Freud: obras psicológicas*. Imago, Rio de Janeiro.
- GEERTJES, G.J.; POSTEMA, J. KAMPING, A.; VAN DELDEN, W; VIDELER, J.J. & VAN DE ZANDE, L. 2004. Allozymes and RAPDs detect little genetic population substructuring in the Caribbean stoplight parrotfish *Sparisoma viride*. *Marine Ecology Progress Series* 279:225-235.
- GOUDET, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices* (version 2.9.3). Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 11 nov 2014.
- GOULD, S.J. 1977. *Ever since Darwin*. Penguin Books, London.
- GRAVES, G.R. 2009. Skeletal correlates of body weight in the Black-billed Streamertail (*Trochilus scitulus*) of Jamaica. *Caribbean Journal of Science* 45(1):69-72.
- GRAVES, J.E. & ROSENBLATT, R.H. 1980. Genetic Relationships of the Color Morphs of the Serranid Fish *Hypoplectrus unicolor*. *Evolution* 34(2):240-245.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C. & CARROLL, S.B. 2011. *Introdução à Genética*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- HAIR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J. & ANDERSON, R.E. 1998. *Multivariate Data Analysis - A Global Perspective*. Pearson, Boston.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., & RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. 1978. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London B - Biological Sciences* 164(995):298-310.
- HARTL, D. & CLARK, A 2010. *Princípios de Genética de Populações*. Artmed, São Paulo.
- HILLIS, D.M. 1987. Molecular Versus Morphological Approaches to Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18:23-42.
- HOCHACHKA, P.W. 1980. *Living Without Oxygen*. Harvard University Press, Cambridge.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54(2):577-94.
- KIMURA, M & CROW, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- KIMURA, M. & OHTA, T. 1971. *Theoretical Aspects of Population Genetics*. Princeton University Press, New Jersey.
- KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at molecular level. *Nature* 217:624-626.
- KLAUTAU, M.; SOLÉ-CAVA, A.M. & BOROJEVIC, R. 1994. Biochemical Systematics of Sibling Sympatric Species of *Clathrina* (Porifera: Calcarea). *Biochemical Systematics and Ecology* 22(4):367-375.
- KNOWLTON, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- KRAMER, B.; VAN DER BANK, H.; FLINT, N.; SAUER-GÜURTH, H. & WINK, M. 2003. Evidence for parapatric speciation in the Mormyrid fish, *Pollimyrus castelnau* (Boulenger, 1911), from the Okavango–Upper Zambezi River Systems: *P. marianne* sp. nov., defined by electric organ discharges, morphology and genetics. *Environmental Biology of Fishes* 77: 47-70.
- LACSON, J.M. 1992. Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and Discovery Bay, Jamaica. *Marine Biology* 112(2):327-331.
- LACSON, J.M. 1994. Fixed allele frequency differences among Palauan and Okinawan populations of the damselfishes *Chrysiptera cyanea* and *Pomacentrus coelestis*. *Marine Biology* 118:359-365.
- LARSON, A. 1998. The comparison of morphological and molecular data in phylogenetic systematics. In: DeSalle, R. & Schierwater, B. (eds.) *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhauser, Basel, pp. 275-296.

- LEVINS, R. & LEWONTIN, R.C. 1985. *The dialectical biologist*. Harvard University Press, London.
- LEVY, J.A. & CONCEIÇÃO, M.B. 1989. Biochemical evidences for two sibling species of genus *Myliobatis* (Chondrichthyes: Myliobatidae) in south Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 94B(4):687-690.
- LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54(2):595-609.
- LEWONTIN, R.C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York.
- LEWONTIN, R.C. 1991. Electrophoresis in the Development of Evolutionary Genetics: Milestone or Millstone? *Genetics* 148:657-662
- MACHORDOM, A.; GARCIA-MARIN, J.L.; SANZ, N.; ALMODOVAR, A. & PLA, C. 1999. Allozyme diversity in brown trout (*Salmo trutta*) from Central Spain: Genetic consequences of restocking. *Freshwater Biology* 41:707-717.
- MAHALANOBIS, P.C. 1936. On the generalized distance in statistics. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* 2(1):49-55.
- MALLET J & WILLMOTT K., 2003. Taxonomy: renaissance of Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution* 18: 57-59.
- MAYDEN, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the sage of the species problem. In: Claridge, M.F.; Dawah, H.A. & Wilson, M.R. (eds). *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp 381-424.
- MAYR E. 1963. *Populations, Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- MAYR, E. & PROVINE, W.B. 1998. *The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the unification of Biology*. Harvard University Press, Cambridge.
- MAYR, E. 1976. Species Concepts and Definitions. *Boston Studies in the Philosophy of Science* 27:353-371.
- MCKELVEY, B. & ALDRICH, H. 1983. Populations, Natural Selection, and Applied Organizational Science. *Administrative Science Quarterly* 28(1):101-128.
- MILLS, L.S. & ALLENDORF, F.W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 6:1509-1518.
- MORITZ, C & HILLIS, D.M. 1996. Molecular Systematics: Context and Controversies. In: Hillis, D.M.; Moritz, C. & Mable, B.K. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer, Massachusetts, pp. 1-13.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283-292.
- NEI, M. 1975. *Molecular Population genetics and Evolution*. North Holland, Amsterdam.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3):583-590.

- NEI, M. 2005. Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 22(12): 2318-2342.
- NEVO, E. 1975. Genetic Variation as a Test of Natural Selection. *PNAS* 72(6): 2145-2149.
- NEVO, E. 1983. Adaptative significance of protein variation. In: Oxford, G.S. & Rollinson, D. (Eds). *Protein polymorphism: Adaptative and taxonomic significance*. Systematics Association by Academic Press, pp. 239-282.
- NEVO, E.; BEILES, A.; KAPLAN, D.; GOLDENBERG, E.M.; OLSVIG-WHITTAKER, L. & NAVEH, Z. 1986. Natural Selection of Allozyme Polymorphisms: A Microsite Test Revealing Ecological Genetic Differentiation in Wild Barley. *Evolution* 40(1):13-20.
- NYGREN, A. 2014. Cryptic polychaete diversity: a review. *Zoologica Scripta* 43(2):172-183.
- OHTA, T. & GILLESPIE, J.H. 1996. Development of neutral and nearly neutral theories. *Theoretical Population Biology* 49:128-142.
- OHTA, T. 1992. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 23, 263-286.
- OOSTERMEIJER, J.G.B.; VAN EIJICK, M.W. & DEN NIJS, J.C.M. 1994. Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia* 97:289-296.
- PALKO, J.B., BEARDSLEY, G.L., RICHARDS, W.J. 1982. Synopsis of the biological data on dolphin-fishes, *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiselis* L. *NOAA Technical Report NMFS Circular 443 - FAO Fish Synopsis* 130:1-28.
- PALSBØLL, P.J. 2009. Genetics, Overview. In: Perrin, W.F.; Wursig J.B. & Thewissen, G.M. (eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, Massachusetts, pp. 483-492.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C. & FUERST, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2):361-382.
- PIMENTA, E.G.; VIDAL, M.; LIMA, G.; AMORIM, A.F. 2007. Analysis on billfish fishery off Rio de Janeiro State, Brazil (2002-03). *Collective Volume of Scientific Papers* 60(5):1571-1575.
- PLA, C. & PUJOLAR, J.M. 1999. Genetic homogeneity of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western Mediterranean and the eastern Atlantic. *Scientia Marina* 63(3-4):337-341
- PROVINE, W.B. 1971. *The Origins of Theoretical Population Genetics*. University of Chicago Press, Chicago.
- PUJOLAR, J.M. & PLA, C. 2002. Occurrence of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) and pompano dolphinfish (*Coryphaena equiselis*) in the Canary Islands revealed by genetic analysis. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36:339-343.
- RIBOLDI, J. 1986. *Análise de agrupamento - “Cluster Analysis” e suas aplicações*. EDUSP, Piracicaba.

- RICE, W.R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R. & ADAMS, M. 1986. *Allozyme electrophoresis - a handbook for animal systematics and population studies*. Academic Press, Sydney, 410p.
- RISING, J.D. & SOMERS, K.M. 1989. The Measurment of Overall Body Size in Birds. *The Auk* 106(4):666-674.
- ROUSSET, F. & RAYMOND, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419.
- ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8(1):103-106.
- SARKAR, S. 2014. The Genomic Challenge to Adaptationism. *The British Journal for the Philosophy of Science* 65:549-572.
- SARTORIO, S.D. 2008. *Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários usando o software R*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 130 p.
- SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5:63-69.
- SELANDER, R.K.; SMITH, M.H.; YANG, S.Y.; JOHNSON, W.E. & GENTRY, J.R. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I: Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics VI*. University of Texas Publishers, Texas, pp. 49-70.
- SHOUBRIDGE, E.A. & HOCHACHKA, P.W. 1980. Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science* 209:308-309.
- SILVA, E.P. 2001. A short history of evolutionary theory. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 8(3):671-687.
- SILVA, E.P. 2009. Genética Marinha. In: Soares-Gomes, A. & Pereira, R.C. (eds). *Biologia Marinha*. Interciências, Rio de Janeiro, pp. 49-70.
- SILVA, E.P. 2013. Allozymes, DNA and Natural Selection: A mollusks tale. In: Lynch, J.R. & Williamson, D.T. (eds). *Natural Selection: Biological Processes, Theory and Role in Evolution*. Nova Biomedical, New York, pp. 303-316.
- SILVA, E.P. & RUSSO, C.A.M. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 420:119-135.
- SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 47:1291-1300.
- SOLÉ-CAVA, A.M. & LEVY, J.A. 1987. Biochemical evidence for a third species of Angel Shark off the east coast of South America. *Biochemical Systematics and Ecology* 15(1):139-144.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1997. *Biometry - The principles and practice of statistics in biological research*. W.H.Freeman, New York.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. 1997. *Biosys-2. a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. University of Illinois, Urbana.

- THORPE, J.P. & SOLÉ-CAVA, A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. *Zoologica Scripta* 23(1):3-18.
- THORPE, J.P. 1983. Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. In: Oxford, G.S. & Rollinson, D. (eds.). *Protein polymorphism: Adaptative and taxonomic significance*. Systematics Association publ, London, pp. 131-152.
- TISELIUS, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society* 33: 524-531.
- TORRES, J.J.; GRIGSBY, M.D. & CLARKE, M.E., 2012. Aerobic and anaerobic metabolism in oxygen minimum layer fishes: the role of alcohol dehydrogenase. *The Journal of Experimental Biology* 215:1905-1914.
- TROMBLEY, S. 2014. *Fifty Thinkers Who Shaped the Modern World*. Atlantic Books, London.
- UTTER, F.; AEBERSOLD, P. & WINANS, G. 1987. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. In: Ryman, N. & Utter, F. *Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Washington, pp. 21-45.
- VAN DER BANK, F.H.; VAN DER BANK, M. & VAN WYKB, B.E. 2001. A review of the use of allozyme electrophoresis in plant systematics. *Biochemical Systematics and Ecology* 29(5):469-483.
- VAN DER BANK, F.H.; WINK, M.; SOEKOE, M & SMIT, N. 2009. Does *Serranochromis altus* (Teleostei: Cichlidae) exist in the Okavango Delta, Botswana? *African Journal of Aquatic Science* 34(1): 57-68.
- VAN DER HEYDEN, S.; BEGER, M.; TOONEN, R.J.; VAN HERWERDEN, L.; JUINIO-MEÑEZ, M.A.; RAVAGO-GOTANCO, R.; FAUVELOT, C.; BERNARDI, G. 2014. The application of genetics to marine management and conservation: examples from the Indo-Pacific. *Bulletin of Marine Science* 90(1):1-36.
- VESTERBERG, O. 1989. History of Electrophoretic Methods. *Journal of Chromatography* 480:3-19.
- VESTERBERG, O. 1993. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis* 14(1):1243-1249.
- VORNANEN, M.; STEYCK, J.A.W. NILSSON, G E. 2009. The anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). In: Richards, J.G.; Farrell, A.P. & Brauner, C.J. (eds.) *Fish Physiology*. Academic Press, Amsterdam, pp. 398-443.
- WAGNER, A. 2008. Neutralism and selectionism: a network-based reconciliation. *Nature Reviews Genetics* 9(12): 965-974.
- WAPLES, R.S. 1986. A Multispecies Approach to the Analysis of Gene Flow in Marine Shore Fishes. *Evolution* 41(2):385-400.
- WAPLES, R.S. 1998. Separating the Wheat from the Chaff: Patterns of Genetic Differentiation in High Gene Flow Species. *The Journal of Heredity* 89(5):438-450.
- WARD, R.D. & GREWE, P.M. 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4:300-325.

- WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F. & WOODWARK, M. 1992. Protein Heterozygosity, Protein Structure, and Taxonomic Differentiation. In: Hecht, M.K.; Wallace, B. & MacIntyre, R.J. (eds.) *Evolutionary Biology*. Plenum Press, New York, pp. 73-159.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.
- WIENS, J.J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 30:327-362.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97-259.
- ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; PAIVA, S. & LARA-KAMEI, M.C.S. 2004. Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* 121:251-257.

APÊNDICE: Resumo apresentado no VI Congresso Brasileiro de Oceanografia

DIFERENÇAS GENÉTICAS ENTRE MORFOTIPOS DE CORYPHENA HIPPURUS (LINNAEUS, 1758) INDICAM ESPÉCIES DISTINTAS OU SELEÇÃO NATURAL.

Palavras-chave: sistemática molecular, genética de populações, recursos pesqueiros, seleção natural

Autores: Alan Bonner da Silva Costa, Michelle Rezende Duarte, Rosa Cristina Corrêa Luz de Souza, Cassiano Monteiro-Neto, Edson Pereira da Silva

Introdução:

Coryphaena hippurus (Linnaeus, 1758) é um peixe de importância comercial da zona epipelágica dos oceanos. Sua distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e seus hábitos migratórios indicam grandes tamanhos de população e alto fluxo gênico na espécie. Porém, pescadores da região de Cabo Frio/RJ identificam, na espécie, dois morfotipos conhecidos como dourado e palombeta que, por isso, são comercializados com valores diferentes. Mais que isto, devido à questão da sobrepesca que afeta parte dos estoques de peixes brasileiros, o status taxonômico destes morfotipos assume grande relevância do ponto de vista da ecologia e biologia da pesca. Em função disto, o status taxonômico dos morfotipos de *C. hippurus* foi investigado geneticamente neste trabalho.

Metodologia:

Setenta e dois indivíduos de *Coryphaena hippurus* (quarenta dourados e trinta e duas palombetas) desembarcados na cidade de Cabo Frio/RJ foram utilizados para análises genéticas pelo método de eletroforese de aloenzimas. A pesca foi feita utilizando-se o espinhel de superfície (capturas em profundidade entre 100 e 160 m para dourado e 100 m para palombeta) e linha de mão (60 m de profundidade, apenas para palombeta). A captura de dourados se deu entre os meses de novembro/2013 e fevereiro/2014, enquanto de palombeta ocorreu entre março e abril/2014. Para a escolha dos loci gênicos a serem estudados, foram feitos testes empíricos do tipo “tecido X enzima” utilizando-se o tampão descontínuo tris-hidróxido de lítio pH 8.0 (TLiOH). Trinta sistemas enzimáticos foram testados contra cinco tecidos (músculo, fígado, coração, gônada e olho) fornecendo resultados interpretáveis para 16 loci gênicos (a-Est-1, a-Est-2, a-Est-3, b-Est-1, b-Est-2, G6pd-2, Ldh, Mdh-1, Mdh-3, Me-1, Odh-1, Odh-2, Pgi, Pgm, Sod e Xod) em músculo, fígado e gônadas. Os dados obtidos a partir da interpretação dos padrões eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GENEPOP 4.2, BYOSIS-2 e Fstat 2.9.3.2. Os valores de P obtidos foram corrigidos com a técnica de Bonferroni, a significância das médias dos índices de fixação foi calculada por bootstrap entre os loci com intervalos de confiança de 95% e 99%. A partir dos valores de θ , foi possível obter uma estimativa do fluxo gênico, que é o número médio de migrantes trocados entre populações a cada geração.

Resultados e Discussão:

A variação gênica inferida a partir de porcentagem de loci polimórficos, número efetivo de alelos por locus e heterozigosidade média esperada não variou muito entre os morfotipos dourado e palombeta (93,8% e 81,3%; 2,8 e 2,7 alelos; 0,362 e 0,373 respectivamente). Após a correção de Bonferroni, foram encontrados quatro desvios significativos em relação ao esperado pela hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg: dois no morfotipo dourado (b-Est-2 e Me) e outros dois no morfotipo palombeta (a-Est-2 e Odh-1). O θ médio entre os morfotipos foi elevado e coerente com um número restrito de migrantes por geração (0,98), embora não significativo. A identidade gênica (I) entre os morfotipos foi baixa (0,815) e compatível com diferenças entre espécies.

Resultados de diferenças genéticas como estas encontradas entre os morfotipos dourado e palombeta na espécie *Coryphaena hippurus* podem ser explicados de duas formas. A primeira é que os dois morfotipos constituem espécies diferentes. A outra explicação é que os dois morfotipos se encontram sob um regime de seleção natural disruptiva.

Hipóteses relacionadas a eventos de seleção natural são pouco parcimoniosas, uma vez que demandam assumir muitos pressupostos. Por exemplo, a existência de desequilíbrios de ligação entre loci (o que não foi encontrado nos morfotipos estudados) e presença de diferenças fenotípicas com impacto na sobrevivência dos indivíduos. Um dos loci estudados (Odh-1) tem sido descrito na literatura como tendo

atividade relacionada ao metabolismo durante a natação sendo, diferentes alelos, capazes de aumentar a taxa de glicólise. Nos morfotipos estudados o locus *Odh-1* apresenta dois alelos em dourado, um dois quais em alta frequência neste morfotipo, enquanto em palombeta este locus apresenta três alelos, nenhum com tendência a fixação. Um cenário de seleção natural explicaria as diferenças de frequência como uma tendência à fixação do alelo responsável por maiores taxas de glicólise (natação explosiva) em dourados (indivíduos adultos) em relação aos jovens (palombetas) que ainda não teriam passado pela “peneira” da seleção natural. Assim, seria possível explicar as grandes diferenças genéticas encontradas entre os morfotipos como produto da mortalidade diferencial. Contudo, este cenário é apenas especulativo, fugindo o seu teste empírico do escopo deste trabalho.

Com relação à hipótese dos morfotipos representarem diferentes espécies, isto tem sido feito em diferentes grupos taxonômicos com base na existência de loci diagnósticos e valores de distância genética. Neste trabalho não foi possível encontrar nenhum locus diagnóstico, embora dois loci apresentem diferenças marcantes nas frequências dos alelos. Contudo, as identidades gênicas encontradas estão dentro dos valores empíricos que indicam populações de espécies diferentes (populações pertencentes à mesma espécie $IG > 0,85$, espécies pertencentes ao mesmo gênero $0,35 < IG < 0,85$, diferentes gêneros $IG < 0,35$).

Conclusão:

Os valores não significativos para o índice de fixação e a ausência de diferentes alelos fixados entre os morfotipos (ausência de loci diagnósticos) exigem prudência na afirmação de que dourado e palombeta representam espécies diferentes. No entanto, os resultados indicam claramente para esta hipótese em detrimento da hipótese de seleção natural, que é muito menos parcimoniosa. Mais marcadores genéticos (nucleares e mitocondriais), estudos morfométricos e evidências biológicas e ecológicas podem contribuir para a decisão definitiva a respeito do status taxonômico dos morfotipos dourado e palombeta na espécie *Coryphaena hippurus*. Esta questão é importante para o manejo dos estoques pesqueiros de dourado na costa brasileira.

Fontes Financiadoras: FAPERJ, CNPQ, CAPES

Subárea de submissão: Recursos Pesqueiros - Avaliação e Gestão Pesqueira

Tipo de apresentação: Oral



ANEXO A: Dados das pescas dos indivíduos de *Coryphaena hippurus* amostrados neste trabalho: nome da embarcação, data do desembarque, localização (latitude e longitude) da embarcação durante a captura, arte de pesca utilizada e as profundidades mínima e máxima que cada coleta foi realizada e gradação comercial. * => informação não disponível (+) = indivíduos amostrados no PCA.

Morfotipo/ Indivíduo	Data do desembarque	Arte de Pesca	Pesqueiro	Embarcação	Latitude	Longitude	Profundi- dade mínima	Profundi- dade máxima
Dourado 1	24/11/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DEUS PROVERÁ	DEUS PROVERÁ	24°04'33,55``S	42°25'55,07``W	100	100
Dourado 2	24/11/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DEUS PROVERÁ	DEUS PROVERÁ	24°04'33,55``S	42°25'55,07``W	100	100
Dourado 3	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 4 (+)	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 5	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 6	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 7	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 8	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 9 (+)	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 10	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 11 (+)	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 12 (+)	12/12/2013	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	24°01'10,60``S	42°00'21,23``W	*	*
Dourado 13	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 14	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 15	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 16	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 17	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 18	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 19	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 20	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 21	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 22	23/01/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°30'47,88``S	42°00'10,47``W	100	120
Dourado 23	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 24	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 25	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 26	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 27 (+)	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 28 (+)	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 29	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 30	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 31	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160
Dourado 32	10/02/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	DONA BENTA	DONA BENTA	23°23'51,60``S	41°39'09,87``w	100	160

Morfotipo/ Indivíduo	Data do desembarque	Arte de Pesca	Pesqueiro	Embarcação	Latitude	Longitude	Profundi- dade mínima	Profundi- dade máxima
Palombeta 1	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 2	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 3	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 4	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 5	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 6	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 7 (+)	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 8	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 9	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 10 (+)	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 11 (+)	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 12 (+)	31/03/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	LESTE DO CABO FRIO	SALMO XL	23°04'30.69"S	041°16'50,13"W	100	140
Palombeta 13	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 14	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 15	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 16	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 17	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 18	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 19	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 20	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 21	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 22	07/04/2014	ESPINHEL DE SUPERFÍCIE	*	LUA NOVA II	*	*	*	*
Palombeta 23	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 24	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 25	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 26	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 27	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 28	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 29	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 30	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 31	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 32	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 33	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 34	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 35	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 36	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 37	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 38	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 39	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 40	10/04/2014	LINHA DE MÃO	LESTE DO CABO FRIO	MARAMORES	23°01'59,84"S	041°26'41,09"W	60	60
Palombeta 41	15/04/2014	LINHA DE MÃO	*	MARAMORES	*	*	*	*
Palombeta 42	15/04/2014	LINHA DE MÃO	*	MARAMORES	*	*	*	*
Palombeta 43	15/04/2014	LINHA DE MÃO	*	MARAMORES	*	*	*	*

ANEXO B: Dados de biologia dos indivíduos de *Coryphaena hippurus* amostrados neste trabalho: morfotipo, graduação comercial, tamanho (em centímetros), peso total (em gramas), sexo, estágio de maturação, peso das gônadas (em gramas), peso do fígado (em gramas), peso do estômago (em gramas) e peso eviscerado (em gramas). * => informação não disponível

Morfotipo	Graduação comercial	Tamanho (cm)	Peso total (g)	Sexo	Estágio de Maturação	Peso gônadas (g)	Peso fígado (g)	Peso estômago (g)	Peso eviscerado (g)
Dourado 1	GRANDE	123	9100	FÊMEA	III	320	148	202	7240
Dourado 2	GRANDE	124	8275	FÊMEA	III	320	144	*	7480
Dourado 3	GRANDE	137	10400	FÊMEA	III	332	156	*	9400
Dourado 4	GRANDE	130	8948	FÊMEA	III	300	146	262	7975
Dourado 5	GRANDE	135	11368	FÊMEA	III	722	188	*	10035
Dourado 6	GRANDE	155	17420	MACHO	INDEFINIDO	76	104	362	16015
Dourado 7	GRANDE	147	14001	FÊMEA	III	662	248	*	12400
Dourado 8	GRANDE	130	11710	MACHO	INDEFINIDO	80	84	*	11033
Dourado 9	GRANDE	129	9300	MACHO	III	320	118	322	8270
Dourado 10	GRANDE	139	10955	FÊMEA	III	1048	150	1110	8850
Dourado 11	GRANDE	131	8715	FÊMEA	III	336	160	2018	8093
Dourado 12	GRANDE	141	13163	FÊMEA	III	440	198	*	11980
Dourado 13	GRANDE	103	5630	FÊMEA	III	832	88	*	4400
Dourado 14	GRANDE	112	5900	FÊMEA	III	440	66	162	4990
Dourado 15	GRANDE	116	7160	FÊMEA	III	280	100	324	6170
Dourado 16	GRANDE	131	11100	FÊMEA	III	1460	180	*	8940
Dourado 17	MÉDIA	99	4200	FÊMEA	III	140	78	*	3690
Dourado 18	MÉDIA	105	4630	FÊMEA	II	146	60	*	4120
Dourado 19	MÉDIA	97	4328	FÊMEA	III	362	62	*	3586
Dourado 20	GRANDE	129	10830	MACHO	INDEFINIDO	62	78	*	10115
Dourado 21	GRANDE	120	8900	FÊMEA	III	750	160	*	7525
Dourado 22	GRANDE	198	5556	FÊMEA	III	222	110	*	4915
Dourado 23	GRANDE	133	10055	FÊMEA	III	614	148	*	8795
Dourado 24	GRANDE	129	8938	FÊMEA	III	688	166	*	7565
Dourado 25	MÉDIA	101	4450	FÊMEA	III	324	104	630	3352
Dourado 26	GRANDE	132	10000	FÊMEA	III	568	184	326	8525
Dourado 27	GRANDE	130	10628	MACHO	INDEFINIDO	52	60	*	10110
Dourado 28	GRANDE	133	9935	FÊMEA	III	322	174	*	8935
Dourado 29	GRANDE	141	13890	MACHO	INDEFINIDO	84	108	*	13115
Dourado 30	GRANDE	139	12025	MACHO	INDEFINIDO	52	86	380	11240
Dourado 31	GRANDE	118	6720	FÊMEA	III	412	110	*	5788
Dourado 32	GRANDE	132	10830	FÊMEA	III	914	118	410	9303

Morfotipo/ Indivíduo	Gradação comercial	Tamanho (cm)	Peso total (g)	Sexo	Estágio de Maturação	Peso gônadas (g)	Peso fígado (g)	Peso eviscerado (g)
Palombeta 1	MEDIA	51	888	M	II	1,5	*	776
Palombeta 2	MEDIA	56	1230	F	II	3,5	37,7	1044
Palombeta 3	GRANDE	62	1434	F	II	3,9	20,9	1246
Palombeta 4	MEDIA	51	820	F	IV OU I	2,9	23,9	716
Palombeta 5	GRANDE	61	1470	F	II	5,7	22,7	1284
Palombeta 6	GRANDE	63	1606	F	II	4	30,5	1410
Palombeta 7	GRANDE	62	1566	M	II	4,5	10,1	1396
Palombeta 8	MEDIA	51	916	N/E	N/E	*	17,2	784
Palombeta 9	MEDIA	58	1272	F	II	3	19	1140
Palombeta 10	GRANDE	61	1622	F	II	4,2	34,6	1410
Palombeta 11	GRANDE	57	1326	M	I OU IV	1,1	17	1206
Palombeta 12	PEQUENA	49	730	F	I OU IV	2,3	*	638
Palombeta 13	GRANDE	62	1690	M	III	11,1	20,69	1474
Palombeta 14	PEQUENA	42	400	M	I	1,47	4,5	340
Palombeta 15	MEDIA	51	910	F	I OU II	2,77	15,27	786
Palombeta 16	GRANDE	57	1310	M	I	2,97	23,47	1180
Palombeta 17	GRANDE	61	1582	F	II	5,34	43	1390
Palombeta 18	MEDIA	54	1080	F	I OU II	2,4	22,24	950
Palombeta 19	MEDIA	54	1110	M	I	1,77	17,2	966
Palombeta 20	PEQUENA	48	800	M	I	1,55	13,93	694
Palombeta 21	GRANDE	58	1352	M	I	1,31	24	1256
Palombeta 22	PEQUENA	48	726	F	I	1,35	9,79	594
Palombeta 23	MEDIA	49	864	M	I	0,65	11,95	752
Palombeta 24	MEDIA	53	1038	F	II	3,67	23,7	888
Palombeta 25	MEDIA	56	1018	F	II	3,15	15,7	908
Palombeta 26	GRANDE	56	1356	F	II	3,2	29,15	1174
Palombeta 27	GRANDE	61	1454	M	II	3,35	17,13	1278
Palombeta 28	MEDIA	52	1110	F	II	3	17,21	896
Palombeta 29	MEDIA	56	1068	F	II	3,37	16,64	938
Palombeta 30	MEDIA	56	1156	M	II	1,24	16,27	1016
Palombeta 31	GRANDE	60	1532	F	II	3	33,77	1318
Palombeta 32	MEDIA	51	846	F	II	1,47	11,38	708
Palombeta 33	PEQUENA	49	760	F	II	1,5	8,7	638
Palombeta 34	MEDIA	53	1016	F	II	2,54	14,33	806
Palombeta 35	GRANDE	55	1902	M	II	1,42	24,29	1024
Palombeta 36	MEDIA	52	1008	F	II	3	20,46	904
Palombeta 37	MEDIA	55	1070	F	II	2,45	14,92	950
Palombeta 38	MEDIA	54	1162	M	I	1,04	10	974
Palombeta 39	MEDIA	59	1288	F	II	3,05	10,02	1126
Palombeta 40	MEDIA	54	1152	M	II	3,22	14,2	1004
Palombeta 41	GRANDE	63	1804	M	II	2	23	1584
Palombeta 42	GRANDE	61	1404	M	II	2,9	17,78	1274
Palombeta 43	GRANDE	67	1720	F	II	9,93	20,12	1544

Morfotipo/ Indivíduo	Gradação comercial	Tamanho (cm)	Peso total (g)	Sexo	Estágio de Maturação	Peso gônadas (g)	Peso eviscerado (g)
Palombeta 44	GRANDE	63	1682	M	II	3,2	1440
Palombeta 45	GRANDE	61	1470	F	II	6,02	1312
Palombeta 46	MEDIA	57	960	F	II	3	872
Palombeta 47	MEDIA	58	1226		?	5,17	1118
Palombeta 48	GRANDE	62	1390	F	II	4,9	1264
Palombeta 49	MEDIA	55	1082	F	II	3,94	1002
Palombeta 50	MEDIA	57	1250	M	II	2,5	1116
Palombeta 51	GRANDE	60	1538	M	II	2,72	1368
Palombeta 52	GRANDE	57	1314	M	II	1,69	1152
Palombeta 53	GRANDE	64	1502	F	II	3,06	1324
Palombeta 54	MEDIA	58	1258	M	II	3	1108
Palombeta 55	MEDIA	57,4	1116	F	I	4,47	982
Palombeta 56	GRANDE	81	3444	M	II	11,6	3134
Palombeta 57	GRANDE	84,1	4090	M	II	8,66	3603
Palombeta 58	GRANDE	71,3	2100	F	II	11,48	1850
Palombeta 59	GRANDE	71,7	2280	M	II	8,89	2050
Palombeta 60	GRANDE	72,5	2200	M	I OU II	6,1	1980
Palombeta 61	MEDIA	54,6	1120	M	I	1,82	980
Palombeta 62	GRANDE	68,5	1870	F	II	9,95	1630
Palombeta 63	GRANDE	77,5	2960	F	I	3,24	2630
Palombeta 64	GRANDE	68,8	2020	M	II	4,11	1840
Palombeta 65	GRANDE	59,2	1470	M	II	6,44	1260
Palombeta 66	PEQUENA	47,9	640	M	I	1,42	530
Palombeta 67	GRANDE	64,5	1710	M	I	3,15	1510
Palombeta 68	GRANDE	61	1122	F	II	6,37	1172
Palombeta 69	MÉDIO	60	1732	F	II	5,42	1178
Palombeta 70	MÉDIO	56,5	1232	F	II	4,21	922
Palombeta 71	MÉDIO	61,7	1174	F	II	4,32	1026
Palombeta 72	MÉDIO	59,8	1328	F	II	6,04	1130
Palombeta 73	MÉDIO	62,3	1108	F	II	4,9	1160
Palombeta 74	MÉDIO	57,6	1668	M	II	3,14	948
Palombeta 75	MÉDIO	57,5	988	F	II	4,26	974
Palombeta 76	GRANDE	68	848	M	II	5,52	1694
Palombeta 77	MÉDIO	58,5	1156	M	II	1,2	1114
Palombeta 78	GRANDE	65,3	1236	M	II	5,84	1468
Palombeta 79	GRANDE	69	1470	M	II	2,56	1520
Palombeta 80	MÉDIO	57,9	788	F	I	1	960
Palombeta 81	MÉDIO	79	866	F	II	3,73	960
Palombeta 82	MÉDIO	60	932	F	II	4,65	1096
Palombeta 83	MÉDIO	58	1264	M	I	1,21	950
Palombeta 84	MÉDIO	60	928	F	II	5,7	1126
Palombeta 85	MÉDIO	58	992	F	II	4,42	1106

ANEXO C: Frequências genotípicas para cada *locus* amostrado

Enzima	Genótipo	Dourado	Palombeta	Enzima	Genótipo	Dourado	Palombeta
α -EST-1	AA	0	5	<i>LDH - 1</i>	AA	27	33
	AB	5	4		AB	2	7
	BB	8	6		AC	0	1
	BC	0	1		AD	0	4
	CC	0	1		N	29	45
	N	13	17				
α -EST-2	AA	1	6	<i>MDH - 1</i>	AA	11	2
	AB	1	2		AB	2	0
	BB	18	14		N	13	2
	BC	5	3		<i>MDH - 3</i>	AA	10
	N	25	25		AB	3	3
α -EST-3	AA	4	4		BB	3	7
	AB	0	2		AC	2	2
	BB	1	9		BC	1	5
	AC	5	0		CC	0	3
	BC	2	2		CD	0	1
	N	12	17		AD	2	1
β -EST-1	AA	1	13		N	21	28
	AB	0	7	<i>ME - 1</i>	AA	5	7
	AC	1	1		AB	0	2
	BB	15	10		BB	1	0
	BC	0	2		N	6	9
	N	17	33		<i>ME - 2</i>	AA	3
β -EST-2	AA	2	3		AB	3	3
	AB	0	6		BB	3	2
	AC	1	1		BC	0	1
	BB	12	5		CC	0	2
	BC	0	1		N	9	8
	CC	1	0	<i>ODH - 1</i>	AA	9	17
	N	16	16		AB	1	2
β -EST-3	AA	2	0		BB	6	9
	AB	1	1		BC	0	3
	AC	0	2		N	16	31
	BC	0	2		<i>ODH - 2</i>	AA	7
	N	3	5		AB	4	1
					AC	0	1
<i>G6PD</i>	AA	3	4		N	11	19
	AB	0	4	<i>PGI</i>	AA	3	6
	AC	0	2		AB	6	14
	AD	0	1		BB	3	1
	BB	1	3		AC	2	6
	BC	0	3		AD	1	1
	BD	0	2		BC	1	0
	CC	0	3		BD	1	0
	N	4	22		CD	0	1
					N	17	29

Enzima	Genótipo	Dourado	Palombeta	Enzima	Genótipo	Dourado	Palombeta
<i>PGM</i>	AA	12	16	<i>SODRH</i>	AA	0	1
	AB	6	6		AB	3	0
	BB	0	0		BB	3	1
	AC	1	0		N	6	2
	CC	1	0		<i>XOD</i>	AA	1
	CD	1	0		BB	10	5
	DD	0	1		AB	4	5
	AE	0	1		AC	1	1
	BE	0	1		BC	2	6
	CE	0	1		CC	0	1
	DE	1	0		N	18	21
	EE	0	1				
	N	22	27				
<i>SOD</i>	AA	32	37				
	N	32	37				

ANEXO D: Tabelas de contingência para as frequências gênicas dos *loci* amostrados.

<i>α-Est-1</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	21	16,467	17	21,533
A+C	5	9,533	17	12,467
Total	26	26	34	34

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 6,005762$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,1113$$

<i>α-Est-2</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	42	37,5	33	37,5
A+C	8	12,5	17	12,5
Total	50	50	50	50

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 4,32$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,2289$$

<i>α-Est-3</i>	Dourado		Palombeta		
Alelos	Obs.	Esp.	Alelos	Obs.	Esp.
A	13	9,517	A	10	13,483
B+C+D	11	14,483	B+C	24	20,517
Total	24	24	Total	34	34

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 3,60334629$$

$$gl = n(n-1)/2 = 6 \text{ (dourado)}$$

$$p = 0,7302 \text{ (dourado)}$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3 \text{ (palombeta)}$$

$$p = 0,3076 \text{ (palombeta)}$$

<i>α-Est-3</i>	Dourado		Palombeta		
Alelos	Obs.	Esp.	Alelos	Obs.	Esp.
B	4	10,759	B	22	15,241
A+C+D	20	13,241	A+C	12	18,759
Total	24	24	Total	34	34

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 13,1290876$$

$$gl = n(n-1)/2 = 6 \text{ (dourado)}$$

$$p = 0,041 \text{ (dourado)}$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3 \text{ (palombeta)}$$

$$p = 0,0044 \text{ (palombeta)}$$

<i>β-Est-1</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	32	22,288	29	38,712
A+C	6	15,712	37	27,289
Total	38	38	66	66,001

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 16,12751$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,0011$$

<i>β-Est-1</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	3	13,519	34	23,481
B+C	35	24,48	32	42,52
Total	38	37,999	66	66,001

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 20,02066$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,0002$$

<i>β-Est-2</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	25	21	17	21
A+C	7	11	15	11
Total	32	32	32	32

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 4,432900433$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,2184$$

<i>β-Est-3</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	5	3	3	5
B+C	1	3	7	5
Total	6	6	10	10

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 4,27$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,2341$$

<i>β-Est-3</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
C	0	1,5	4	2,5
A+B	6	4,5	6	7,5
Total	6	6	10	10

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 3,2$$

$$gl = n(n-1)/2 = 3$$

$$p = 0,3618$$

<i>G6pd</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	6	3,231	15	17,769
B+C+D	2	4,769	29	26,231
Total	8	8	44	44

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 4,7046$$

$$gl = n(n-1)/2 = 6$$

$$p = 0,5822$$

<i>Ldh</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	56	52,514	78	81,486
B+C+D	2	5,487	12	8,513
Total	58	58,001	90	89,999

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 4,024843$$

gl= n (n-1)/2 = 6

p = 0,6733

<i>Mdh-1</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	24	24,267	4	3,733
B	2	1,733	0	0,267
Total	26	26	4	4

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 0,330171$$

gl= n (n-1)/2 = 1

p = 0,5656

<i>Mdh-3</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	27	19,286	18	25,714
B+C+D	15	22,714	38	30,286
Total	42	42	56	56

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 8,173119$$

gl= n (n-1)/2 = 6

p = 0,2257

<i>Mdh-3</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	10	19,286	22	18,286
A+C+D	32	22,714	34	37,714
Total	42	42	56	56

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 9,38725$$

gl= n (n-1)/2 = 6

p = 0,1529

<i>Me-1</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	10	10,4	16	15,6
B	2	1,6	2	2,4
Total	12	12	18	18

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 0,192308$$

gl= n (n-1)/2 = 1

p = 0,661

<i>Me-2</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	9	9,067	8	7,933
A+C	7	6,933	6	6,067
Total	16	16	14	14

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 0,002448$$

gl= n (n-1)/2 = 3

p = 1

<i>Odh-I</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	19	18,723	36	36,277
B+C	13	13,276	26	25,724
Total	32	31,999	62	62,001

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 2,4771$$

gl= n (n-1)/2 = 3

p = 0,4794

<i>Odh-2</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	19	20,167	36	34,833
B+C	3	1,834	2	3,166
Total	22	22,001	38	37,999

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 1,277359$$

gl= n (n-1)/2 = 3

p = 0,7345

<i>Pgi</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	15	17,739	33	30,261
B+C+D	19	16,261	25	27,739
Total	34	34	58	58

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 1,402641$$

gl= n (n-1)/2 = 6

p = 0,9841

<i>Pgm</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
A	31	31,429	39	38,571
B+C+D+E	13	12,572	15	15,428
Total	44	44,001	54	53,999

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 0,037072$$

gl= n (n-1)/2 = 10

p = 1

<i>Sordh</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	9	8,25	2	2,75
A	3	3,75	2	1,25
Total	12	12	4	4

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 0,872727$$

gl= n (n-1)/2 = 1

p = 0,3502

<i>Xod</i>	Dourado		Palombeta	
Alelos	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
B	26	21,692	21	25,308
A+C	10	14,307	21	16,693
Total	36	35,999	42	42,001

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e] = 3,996727$$

gl= n (n-1)/2 = 3

p = 0,2618

ANEXO E: Resultados dos testes realizados para desequilíbrio de ligação entre os *loci*. (NA: resultados indisponíveis)

	dourado	palombeta	dourado x palombeta
a-est- X a-est-	0.85205	0.20877	0.32105
a-est- X a-est-	0.68216	0.15673	0.20541
a-est- X b-est-	0.86140	NA	0.86140
a-est- X b-est-	0.19108	NA	0.19108
a-est- X b-est-	NA	NA	NA
a-est- X g6pd	NA	0.64985	0.64985
a-est- X ldh	0.88860	0.83392	0.92310
a-est- X mdh-1	NA	NA	NA
a-est- X mdh-3	0.99342	0.21301	0.74708
a-est- X me-1	NA	0.58056	0.58056
a-est- X me-2	NA	1.00000	1.00000
a-est- X odh-1	0.18289	NA	0.18289
a-est- X odh-2	1.00000	NA	1.00000
a-est- X pgi	0.39167	0.29240	0.17515
a-est- X pgm	0.96930	0.96535	0.98626
a-est- X sod	NA	NA	NA
a-est- X sordh	1.00000	NA	1.00000
a-est- X xod	0.38129	0.38567	0.22193
a-est- X a-est-	0.17939	0.35702	0.13421
a-est- X b-est-	0.59152	0.65980	0.59269
a-est- X b-est-	0.04488	1.00000	0.10702
a-est- X b-est-	NA	NA	NA
a-est- X g6pd	0.40219	0.29225	0.13026
a-est- X ldh	0.12763	0.35760	0.16199
a-est- X mdh-1	0.71140	NA	0.71140
a-est- X mdh-3	0.62325	0.30746	0.43450
a-est- X me-1	1.00000	0.92544	0.99269
a-est- X me-2	0.79079	0.30175	0.36009
a-est- X odh-1	0.17953	0.51974	0.30716
a-est- X odh-2	NA	NA	NA
a-est- X pgi	0.46608	0.42339	0.39635
a-est- X pgm	0.96915	0.81155	0.96564

a-est- X sod	NA	NA	NA
a-est- X sordh	0.81813	NA	0.81813
a-est- X xod	0.12778	0.57763	0.15643
a-est- X b-est-	0.88962	0.81067	0.91272
a-est- X b-est-	0.63421	1.00000	0.74108
a-est- X b-est-	NA	NA	NA
a-est- X g6pd	NA	1.00000	1.00000
a-est- X ldh	NA	0.84635	0.84635
a-est- X mdh-1	0.71155	NA	0.71155
a-est- X mdh-3	1.00000	0.65789	0.85921
a-est- X me-1	NA	0.74386	0.74386
a-est- X me-2	1.00000	0.35234	0.47222
a-est- X odh-1	1.00000	0.90395	0.98056
a-est- X odh-2	NA	NA	NA
a-est- X pgi	0.71140	0.50044	0.49459
a-est- X pgm	0.40205	0.55599	0.43260
a-est- X sod	NA	NA	NA
a-est- X sordh	NA	NA	NA
a-est- X xod	0.25336	0.64737	0.27208
b-est- X b-est-	0.28582	0.26798	0.13260
b-est- X b-est-	NA	1.00000	1.00000
b-est- X g6pd	NA	1.00000	1.00000
b-est- X ldh	1.00000	0.05556	0.31579
b-est- X mdh-1	0.10468	NA	0.10468
b-est- X mdh-3	0.64620	0.49211	0.61711
b-est- X me-1	1.00000	NA	1.00000
b-est- X me-2	1.00000	NA	1.00000
b-est- X odh-1	0.72675	0.93523	0.87398
b-est- X odh-2	0.22865	0.79912	0.19810
b-est- X pgi	0.12500	0.40980	0.15716
b-est- X pgm	0.72939	0.06082	0.21579
b-est- X sod	NA	NA	NA
b-est- X sordh	1.00000	NA	1.00000
b-est- X xod	0.18494	0.86711	0.27193
b-est- X b-est-	NA	NA	NA
b-est- X g6pd	NA	NA	NA
b-est- X ldh	0.73684	NA	0.73684

b-est- X mdh-1	0.14985	NA	0.14985
b-est- X mdh-3	0.36871	NA	0.36871
b-est- X me-1	1.00000	NA	1.00000
b-est- X me-2	0.93085	NA	0.93085
b-est- X odh-1	0.35731	0.62895	0.30190
b-est- X odh-2	0.98129	NA	0.98129
b-est- X pgi	0.24094	1.00000	0.31842
b-est- X pgm	0.84357	1.00000	0.85760
b-est- X sod	NA	NA	NA
b-est- X sordh	NA	NA	NA
b-est- X xod	0.33538	1.00000	0.35497
b-est- X g6pd	NA	NA	NA
b-est- X ldh	NA	NA	NA
b-est- X mdh-1	NA	NA	NA
b-est- X mdh-3	1.00000	NA	1.00000
b-est- X me-1	NA	NA	NA
b-est- X me-2	NA	NA	NA
b-est- X odh-1	NA	NA	NA
b-est- X odh-2	NA	NA	NA
b-est- X pgi	NA	NA	NA
b-est- X pgm	NA	NA	NA
b-est- X sod	NA	NA	NA
b-est- X sordh	1.00000	NA	1.00000
b-est- X xod	NA	NA	NA
g6pd X ldh	NA	0.36988	0.36988
g6pd X mdh-1	NA	NA	NA
g6pd X mdh-3	1.00000	0.13553	0.28143
g6pd X me-1	NA	NA	NA
g6pd X me-2	NA	NA	NA
g6pd X odh-1	NA	NA	NA
g6pd X odh-2	NA	0.81418	0.81418
g6pd X pgi	NA	0.52091	0.52091
g6pd X pgm	NA	1.00000	1.00000
g6pd X sod	NA	NA	NA
g6pd X sordh	NA	1.00000	1.00000
g6pd X xod	NA	0.01944	0.01944
ldh X mdh-1	0.84035	NA	0.84035

ldh X mdh-3	0.43904	0.20760	0.23012
ldh X me-1	0.98231	0.39123	0.70775
ldh X me-2	NA	0.70351	0.70351
ldh X odh-1	0.72778	0.22529	0.32690
ldh X odh-2	NA	0.77485	0.77485
ldh X pgi	0.97880	0.13977	0.44795
ldh X pgm	0.84225	0.18582	0.46009
ldh X sod	NA	NA	NA
ldh X sordh	NA	1.00000	1.00000
ldh X xod	0.06915	0.46213	0.13026
mdh-1 X mdh-3	0.79532	NA	0.79532
mdh-1 X me-1	NA	NA	NA
mdh-1 X me-2	0.20512	NA	0.20512
mdh-1 X odh-1	0.71433	NA	0.71433
mdh-1 X odh-2	0.93611	NA	0.93611
mdh-1 X pgi	NA	NA	NA
mdh-1 X pgm	0.97295	NA	0.97295
mdh-1 X sod	NA	NA	NA
mdh-1 X sordh	NA	NA	NA
mdh-1 X xod	0.29985	NA	0.29985
mdh-3 X me-1	NA	0.27588	0.27588
mdh-3 X me-2	1.00000	0.36009	0.84532
mdh-3 X odh-1	0.81725	NA	0.81725
mdh-3 X odh-2	1.00000	0.00219	0.00848
mdh-3 X pgi	0.18655	0.50614	0.23319
mdh-3 X pgm	0.24035	0.67310	0.38801
mdh-3 X sod	NA	NA	NA
mdh-3 X sordh	1.00000	NA	1.00000
mdh-3 X xod	0.55585	0.28085	0.32851
me-1 X me-2	1.00000	1.00000	1.00000
me-1 X odh-1	NA	NA	NA
me-1 X odh-2	NA	NA	NA
me-1 X pgi	0.86257	0.88801	0.91111
me-1 X pgm	1.00000	0.77807	0.94781
me-1 X sod	NA	NA	NA
me-1 X sordh	NA	NA	NA
me-1 X xod	1.00000	NA	1.00000

me-2 X odh-1	NA	NA	NA
me-2 X odh-2	1.00000	NA	1.00000
me-2 X pgi	1.00000	NA	1.00000
me-2 X pgm	1.00000	1.00000	1.00000
me-2 X sod	NA	NA	NA
me-2 X sordh	NA	NA	NA
me-2 X xod	1.00000	NA	1.00000
odh-1 X odh-2	NA	NA	NA
odh-1 X pgi	0.51096	0.61886	0.58801
odh-1 X pgm	0.39386	0.77675	0.68962
odh-1 X sod	NA	NA	NA
odh-1 X sordh	0.94678	NA	0.94678
odh-1 X xod	0.70965	0.01535	0.07266
odh-2 X pgi	NA	0.53801	0.53801
odh-2 X pgm	0.55541	0.92573	0.86520
odh-2 X sod	NA	NA	NA
odh-2 X sordh	NA	NA	NA
odh-2 X xod	0.47515	0.08480	0.09050
pgi X pgm	0.62018	0.04810	0.07588
pgi X sod	NA	NA	NA
pgi X sordh	1.00000	NA	1.00000
pgi X xod	0.93977	1.00000	0.99196
pgm X sod	NA	NA	NA
pgm X sordh	0.65088	NA	0.65088
pgm X xod	0.97924	1.00000	0.99591
sod X sordh	NA	NA	NA
sod X xod	NA	NA	NA
sordh X xod	0.33860	NA	0.33860