

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

**JÉSSICA LOPES NETO**

**VARIAÇÃO GÊNICA DE UM LOCO DE MICROSSATÉLITE  
(*Chi002*) EM DOIS MORFOTIPOS COMERCIAIS (DOURADO E  
PALOMBETA) DA ESPÉCIE *Coryphaena hippurus*  
(ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE) NA COSTA DO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**NITERÓI, RJ  
2019**

**JÉSSICA LOPES NETO**

**VARIAÇÃO GÊNICA DE UM LOCO DE MICROSSATÉLITE  
(*Chi002*) EM DOIS MORFOTIPOS COMERCIAIS (DOURADO E  
PALOMBETA) DA ESPÉCIE *Coryphaena hippurus*  
(ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE) NA COSTA DO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Monografia apresentada ao Curso de  
graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal Fluminense,  
como requisito parcial para obtenção  
do Grau de Bacharel.

**Orientadores: Dr. Edson Pereira da Silva  
Dra. Michelle Rezende Duarte**

**NITERÓI, RJ  
2019**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

N469v    Neto, Jéssica Lopes  
          VARIAÇÃO GÊNICA DE UM LOCO DE MICROSSATÉLITE (Chi002) EM  
          DOIS MORFOTIPOS COMERCIAIS (DOURADO E PALOMBETA) DA ESPÉCIE  
          Coryphaena hippurus (ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE) NA COSTA  
          DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Jéssica Lopes Neto ; Edson  
          Pereira da Silva, orientador ; Michelle Rezende Duarte,  
          coorientadora. Niterói, 2019.  
          56 f. : il.

          Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências  
          Biológicas)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de  
          Biologia, Niterói, 2019.

          1. Genética Marinha. 2. Marcadores Moleculares. 3. Peixes  
          Marinhos. 4. Pesca. 5. Produção intelectual. I. Silva, Edson  
          Pereira da, orientador. II. Duarte, Michelle Rezende,  
          coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto  
          de Biologia. IV. Título.

CDD -

## ATA DE AVALIAÇÃO DE MONOGRAFIA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade: Bacharel – Biologia Marinha.

Aos doze dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às nove horas, na sala 13 do Espaço Multidisciplinar do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, reuniu-se a banca examinadora constituída pelos professores Edson Pereira da Silva (presidente), Alan Bonner da Silva Costa (examinador) e Paulo Roberto Camponez de Almeida (examinador), para avaliação da monografia de final de curso da aluna **Jéssica Lopes Neto**, matrícula UFF 113.044.034, intitulada “**VARIAÇÃO GÊNICA DE UM LOCO DE MICROSSATÉLITE (Chi002) EM DOIS MORFOTIPOS COMERCIAIS (DOURADO E PALOMBETA) DA ESPÉCIE *Coryphaena hippurus* (ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE) NA COSTA DO RIO DE JANEIRO**”, orientada pelos professores Edson Pereira da Silva e Michelle Rezende Duarte, que após apresentação foi julgada e aprovada com média final Aprovado com dez (10,0).

Niterói, 12 de julho de 2019.


Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Edson Pereira da Silva – UFF

Nota final 10,0

  
Prof. Msc. Alan Bonner da Silva Costa – SESI/SENAI

Nota final 10,0

  
Prof. Msc. Paulo Roberto Camponez de Almeida – UFF

Nota final 10,0

**JÉSSICA LOPES NETO**

**VARIAÇÃO GÊNICA DE UM LOCO DE MICROSSATÉLITE  
(*Chi002*) EM DOIS MORFOTIPOS COMERCIAIS (DOURADO E  
PALOMBETA) DA ESPÉCIE *Coryphaena hippurus*  
(ACTINOPTERYGII: CORYPHAENIDAE) NA COSTA DO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Monografia de conclusão de curso  
apresentada na Universidade Federal  
Fluminense como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Edson Pereira da Silva (Presidente)  
Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense – UFF

Dra. Michelle Rezende Duarte (Orientadora)  
Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense – UFF

MSc. Alan Bonner da Silva Costa  
SESI/SENAI- Macaé, RJ

MSc. Paulo Roberto Camponez de Almeida  
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha e Ambientes  
Costeiros – UFF

MSc. Paulo Ricardo Alves Gomes Freire  
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha e Ambientes  
Costeiros – UFF

**NITERÓI, RJ  
2019**

Dedico esse trabalho a todos aqueles que tiveram paciência (ou não) de me ouvir reclamar da vida constantemente nesses muitos anos de graduação.

## AGRADECIMENTOS

Bom, seguindo o padrão de qualidade de agradecimentos vou começar pelo começo e agradecer aos meus pais. Esses dois são pessoas que dão muito duro todo dia, desde sempre, pra oferecer a mim e aos meus irmãos tudo aquilo que eles nunca puderam ter. Não tiveram, por exemplo, essa oportunidade que estou tendo agora de concluir os estudos numa Universidade Federal e, na real, passaram muito longe disso. Eu mesma, como filha de uma empregada e um garçom nem devia estar aqui, vide todas as panelas que já foram batidas pela classe média por aí, não é mesmo? Contudo, aqui estou e, olha só, finalmente (!!!) vou me formar. Mas enfim, pai e mãe, só queria dizer que sou eternamente grata por tudo o que vocês já fizeram, fazem e ainda farão por mim nessa vida. Eu definitivamente não estaria onde estou agora se não tivesse o apoio que vocês sempre me deram pra estudar (e não só pra isso).

Em segundo lugar, agradeço à minha irmã, minha melhor amiga nessa vida que sempre me apoiou nos piores momentos possíveis e que sempre esteve comigo nos bons momentos também, de uma forma ou de outra. Só você pra ter paciência (ou não) pra todas as bobagens que eu invento e que só a gente entende. Agradeço também ao meu irmão que só é chato e me enche o saco porque eu moro com ele, mas que é um menino (homem já, né?) gente boa e muito fechamento. Vou agradecer aos meus gatos também (que nunca saberão da existência dessa monografia), por serem fofos e me desestressarem quando eu chegava em casa de cabeça quente com a faculdade e por sempre ficarem, literalmente, ao meu lado todas as vezes que tive que me trancar no quarto pra estudar. Além disso, agradeço à minha extensa, enorme, infinita família que com seu jeitinho de gente do nordeste, que eu tanto amo, sempre me apoiaram e torceram muito por mim.

Agradeço agora às duas pessoas sem as quais essa monografia jamais teria sido possível, Edson e Michelle, por serem os melhores orientadores que eu poderia ter. Acho que Michelle discorda disso, pois acha que é responsável pelo meu desgosto com a genética marinha (o que não é verdade!), mas digo isso de coração. Obrigada por toda a paciência, compreensão e o apoio incondicional que me deram em diversos momentos durante esse período que passei no LGME, não somente com relação a questões acadêmicas. Agradeço também por todas as coisas que aprendi com vocês nesses anos de convivência, coisas que vou levar pra vida, que ajudaram na minha formação profissional e também pessoal.

Agradeço ainda ao laboratório ECOPECA-UFF pela colaboração científica que possibilitou este trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus companheiros de laboratório (em especial dona Maíra Navarro, que é pra ela não dizer que sou ingrata) por todos os momentos compartilhados, fossem eles de desespero e preocupação ou de descontração e falação de merda. Vocês todos certamente tornaram o ambiente de trabalho algo muito mais prazeroso e gratificante, nem que fosse só por estarem ali trabalhando do meu lado, fazendo com que eu não me sentisse tão sozinha nessa missão de ser uma estudante universitária (muito “classe média sofre” ela).

Ah! Fingi que não ia falar só pra fazer um suspense, mas também quero agradecer à srta. Ana Cristina por tantas coisas que nem dá pra começar a falar aqui (senão os agradecimentos ficarão maiores que a própria monografia), mas, principalmente, por ser a melhor revisora de artigos de todos os tempos. Agradeço também a várias outras pessoinhas que passaram pela minha vida nesse período de faculdade e que me marcaram para sempre, mas que não citarei nomes, apesar de ter uma pessoa em especial.

## RESUMO

*Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758 é uma espécie de peixe marinho bastante explorada pela pesca industrial, artesanal e esportiva em diversas partes do mundo. No Brasil, figura entre os principais recursos pesqueiros, tendo representado, no estado do Rio de Janeiro, uma média de 1,7% do total da produção pesqueira marinha desembarcada entre os anos de 2011 e 2017. Diante da grande pressão de pesca à qual essa espécie está submetida, informações sobre sua variação gênica são fundamentais para a criação de planos de manejo e medidas de conservação que permitam o uso racional desse recurso. Assim, o presente trabalho se propôs a descrever a variação gênica para um loco de microssatélite (*Chi002*) para os dois morfotipos de *Coryphaena hippurus* que ocorrem na costa do estado do Rio de Janeiro. Os resultados indicaram níveis de variação gênica elevados, embora, menores do que o observado para a espécie em outros trabalhos utilizando marcadores moleculares dessa natureza. Com relação ao status taxonômico dos morfotipos, não foram encontradas evidências que corroborem que eles sejam unidades naturais verdadeiras. Por fim, foram observados alguns desequilíbrios de Hardy-Weinberg que podem ser explicados por duas hipóteses não mutuamente exclusivas, que são cruzamentos preferenciais na espécie e erros de genotipagem associados à interpretação conservadora dos resultados.

**Palavras-chave:** Genética Marinha, Marcadores Moleculares, Peixes Marinhos, Pesca.



## ABSTRACT

*Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758 is a marine fish heavily exploited by industrial, artisanal and sportive fisheries around the world. Along Brazilian coast it represents an important fisheries resource, being responsible in Rio de Janeiro for an average of 1,7% of the total production shored in the state in between 2011 and 2017. Due to this high fisheries pressure, information on genetic variation and other population genetics parameters are desirable in order to inform conservation and management plans and also a rational exploitation of this resource. Therefore, the main aim of this research was to describe levels of genetic variation to a microsatellite loci (*Chi002*) for two commercial morphotypes (Palombeta and Dourado) occurring at Rio de Janeiro coast. Results showed high levels of genetic variation although still lower than what is commonly described for the species when using molecular markers such as microsatellites. Concerning the taxonomic status of the studied morphotypes, no genetic evidence could be found that they are natural units. Finally, Hardy-Weinberg disequilibrium registered can be explained by preferential mating or/and due the conservative approach which was used in the interpretation of the results.

**Keywords:** Fisheries, Marine Fishes, Marine Genetics, Molecular Markers.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfotipos de *Coryphaena hippurus*. (A) Morfotipo maior ou Dourado. (B) Morfotipo menor ou Palombeta.....10
- Figura 2.** Mapa da região de Cabo Frio, com os pontos de captura de *Coryphaena hippurus* destacados.....12
- Figura 3.** Foto do gel de agarose (2,5%), corado com GelRed® e visualizado sob luz UV. Exemplos de espécimes que apresentaram resultados para o loco *Chi002* e seus respectivos genótipos: Dourado 9 (BB), Dourado 10 (CC) e Dourado 17 (CD).....15
- Figura 4.** Resultado da análise Bayesiana. O maior valor médio de  $\text{LnP(D)}$  foi para  $K = 1$  ( $-165,9 \pm 0,094$ ; As barras representam os desvios padrão).....17

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estatística pesqueira para o estado do Rio de Janeiro com ênfase na produção de <i>Coryphaena hippurus</i> entre os anos de 2011 e 2017.....	6
<b>Tabela 2.</b> Coordenadas geográficas dos pontos de captura de <i>Coryphaena hippurus</i> .....	11
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> referentes ao loco de microssatélite de <i>Coryphaena hippurus</i> utilizado neste trabalho.....	13
<b>Tabela 4.</b> Resultados das principais estimativas de genética de populações para o loco <i>Chi002</i> nos dois morfotipos de <i>Coryphaena hippurus</i> . Onde: N = número de espécimes amostrados para cada morfotipo; a, b, c, d = frequência de cada um dos alelos amostrados; $H_O$ = heterozigosidade observada; $H_E$ = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F = índice de endocruzamento total; f = índice de endocruzamento dentro de cada morfotipo; $\theta$ = índice de endocruzamento de cada morfotipo em relação ao total; I = identidade gênica (NEI, 1972).....	16
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos ao analisar os morfotipos como um único grupo. Onde: N = número de espécimes amostrados; a, b, c, d = frequência de cada um dos alelos amostrados; $H_O$ = heterozigosidade observada; $H_E$ = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	17
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre os resultados observados em BONNER <i>et al.</i> (2017) e no presente trabalho. Onde: N = número de espécimes amostrados para cada morfotipo; $N_A$ = número de alelos; $H_O$ = heterozigosidade observada; $H_E$ = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F = índice de endocruzamento total; f = índice de endocruzamento dentro de cada morfotipo; $\theta$ = índice de endocruzamento de cada morfotipo em relação ao total; I = identidade gênica (NEI, 1972).....	18

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.....	mtDNA
Ácido desoxirribonucleico.....	DNA
Ácido etilenodiamino tetra-acético.....	EDTA
Ácido ribonucleico.....	RNA
Água deionizada purificada em sistema da Millipore Corporation.....	MiliQ
Centímetro.....	cm
Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade I.....	COI
Cloreto de magnésio.....	MgCl <sub>2</sub>
Desoxirribonucleotídeo fosfatado.....	dNTP
Dinucleótido de nicotinamida e adenina.....	NADH
Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro.....	FIPERJ
Graus centígrados.....	°C
Laboratório de Biologia do Nécton e Ecologia Pesqueira.....	ECOPESCA
Logaritmo neperiano da estimativa das probabilidades de K.....	LnP(D)
Microlitro.....	μl
Micromolar.....	μM
Miliampère.....	mA
Milimolar.....	mM
Monte Carlo via Cadeias de Markov.....	MCMC
NADH desidrogenase subunidade I.....	NDI
Número de populações assumidas após uma execução do programa Structure.....	K
Oeste.....	W
Pares de base.....	bp
Polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição.....	RFLP
Probabilidade.....	P
Projeto de Monitoramento da Atividade Pesqueira no Estado do RJ.....	PMAP-RJ
Quilômetro quadrado.....	Km <sup>2</sup>
Quilograma.....	kg
Quilômetro.....	Km
Reação em cadeia da polimerase.....	PCR
Rio de Janeiro.....	RJ
Sequenciamento de nova geração.....	NGS
Sul.....	S
<i>Thermus aquaticus</i> .....	Taq
Tonelada.....	t
Tris-Borato-EDTA.....	TBE
Ultravioleta.....	UV
Unidade.....	U
Universidade Federal Fluminense.....	UFF
Volt.....	V

## SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA .....	III
ATA DE AVALIAÇÃO DE MONOGRAFIA .....	IV
AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A Genética e o Mar.....	1
1.2 Genética de Populações de <i>Coryphaena hippurus</i> Linnaeus 1758 .....	5
1.2.1 Mundo .....	5
1.2.2 Brasil.....	8
2. OBJETIVOS .....	9
2.1 Objetivo Geral .....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1 Amostragem e Área de Estudo.....	10
3.2 Extração e Amplificação de DNA .....	12
3.3 Análise dos Dados.....	13
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO .....	18
6. CONCLUSÕES .....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
8. APÊNDICES.....	36
8.1 A genética e o mar. Revista Ciência Elementar.....	37

## 1. INTRODUÇÃO

A primeira parte dessa introdução se dedica a fazer uma pequena revisão sobre os estudos de genética aplicados a modelos marinhos, a chamada genética marinha. Ela está baseada em artigo publicado na revista de divulgação científica portuguesa “Ciência Elementar” (NETO, J. L.; DUARTE, M. R.; SILVA, E. P. A genética e o mar. *Revista Ciência Elementar* 7(1):015, 2019. Ver Apêndice 1). Na segunda parte, a produção bibliográfica referente à genética das populações de *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758, ao redor do mundo e no Brasil, é revisada, especialmente no que se refere ao uso de marcadores moleculares.

### 1.1 A Genética e o Mar

Entende-se por genética a ciência que estuda os fatores hereditários (ou genes) dos indivíduos e as leis que governam sua transmissão de geração para geração (GRIFFITHS *et al.*, 2016; MOREIRA, 2013a). A constituição genética dos indivíduos pode ser definida como o conjunto de genes (ou genótipos ou alelos) que um indivíduo possui, sendo os genes a unidade funcional da hereditariedade (MOREIRA, 2013b). Quando o interesse é pela mudança na constituição genética dos grupos de indivíduos (as populações) ao longo do tempo, se está estudando genética de populações. Ou seja, a genética de populações estuda como a proporção dos genes muda de uma geração para outra. Mais que isso, ela preocupa-se em entender o que determina que essas mudanças aconteçam (HARTL & CLARK, 2010; SILVA, 2001). Pode-se dizer, então, que estudá-la é estudar o processo evolutivo (SILVA, 2009).

Quando a produção de informações referentes à genética de populações diz respeito a populações naturais de organismos que vivem nos estuários, mares e oceanos, entra-se no campo da genética marinha, que pode ser definida como a ciência que

estuda a genética de populações de organismos marinhos utilizando-se de uma perspectiva evolutiva (pois trabalha com a mudança) e ecológica (uma vez que também leva em consideração os ambientes em que esses organismos vivem) (SILVA, 2009).

Há registros de estudos realizados no campo da genética marinha que datam desde a década de 1910 (SCHMIDT, 1918), contudo, em seu início, essa área de conhecimento possuía uma aplicação bastante restrita, visto que enfrentava problemas de ordem prática no que dizia respeito aos tipos de organismos marinhos que podiam ser estudados. Isso se devia em grande parte ao fato de que para se estudar genética de populações era necessário manter as populações estudadas em cultivos laboratoriais de modo que fosse possível a realização de cruzamentos controlados. No caso de espécies marinhas, essa possibilidade era muito limitada. Por exemplo, não era possível estudar organismos de grande porte e, naquele tempo, o cultivo da maioria das espécies marinhas não era viável. Assim, por conta dessas limitações, o desenvolvimento da genética marinha se deu de forma tardia no século XX (SILVA, 2009).

Tal cenário de limitações sofreu uma mudança apenas no final da década de 1960, com a aplicação da técnica de eletroforese de aloenzimas ao estudo da constituição genética dos indivíduos nas populações naturais (HUBBY & LEWONTIN, 1966; LEWONTIN & HUBBY, 1966). As aloenzimas são proteínas que se comportam como diferentes alelos de um mesmo gene e a técnica consiste na separação dessas proteínas por meio da sua migração ao longo de um suporte (que pode ser um gel de amido, agarose ou poliacrilamida ou um papel, como o acetato de celulose) sob a ação de uma corrente elétrica (SOLFERINI & SELIVON, 2012). Depois que essas proteínas são separadas e coradas por processos bioquímicos elas apresentam um padrão de bandas que pode ser interpretado como os genótipos dos indivíduos.

O fato de que o padrão de bandas de proteínas colorido em um gel pode ser interpretado como alelos advém do chamado “dogma central da biologia molecular” que diz que o DNA é transcrito em RNA e este, por sua vez, traduzido em proteínas (CRICK, 1970; MOREIRA, 2015). Assim, assume-se que amostrar a variação de aloenzimas é, também, amostrar variação do DNA (HUBBY & LEWONTIN, 1966). Com isso, estava sendo inaugurado o uso daquilo que chamamos de marcadores moleculares, que nada mais são que moléculas que representam genes com algum tipo de variação, de modo que podem ser usados para amostragem da constituição genética

das populações naturais (SOLÉ-CAVA, 2001). As aloenzimas foram, portanto, o primeiro marcador molecular da história de uma ciência que estava nascendo naquele momento, a genética molecular.

Desde então, as espécies marinhas começaram a ser estudadas rotineiramente com o novo método, visto que não havia mais a necessidade do uso de cultivos laboratoriais e a realização de cruzamentos controlados para se estudar genética marinha. Em muitos casos, apenas uma amostra de tecido dos indivíduos era necessária para o estudo genético das populações desses organismos (SOLFERINI & SELIVON, 2012). Contudo, ainda que a eletroforese de aloenzimas seja usada amplamente, ela apresenta algumas limitações que precisam ser pontuadas.

A primeira delas diz respeito a se assumir uma correspondência entre os genes e seus produtos (as proteínas). Ao passo que os aminoácidos são as unidades formadoras das cadeias proteicas, os nucleotídeos são as unidades formadoras dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). No código genético, trincas de nucleotídeos, conhecidas como códons, são as responsáveis por codificar os vinte aminoácidos principais que constituem as proteínas. Entretanto, o código genético possui a característica de ser degenerado, o que significa que diferentes códons podem codificar o mesmo aminoácido (MOREIRA, 2014). Isso quer dizer que algumas mudanças de códons não vão acarretar mudança do aminoácido codificado. Desta forma, pode-se dizer que há casos em que ocorrem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA sem que ocorram mudanças na sequência de aminoácidos da proteína.

A segunda limitação da técnica refere-se à carga elétrica dos aminoácidos. Sabe-se que dos vinte aminoácidos que constituem as cadeias proteicas cinco apresentam carga elétrica, sendo três de carga positiva e dois de carga negativa. Diante disso, proteínas com constituições diferentes irão apresentar cargas diferentes e, portanto, padrões de migração eletroforética diferentes. Nessa circunstância, o que se dá é que a substituição de aminoácidos que acontece, ocorre sem mudar a carga, ou seja, os aminoácidos trocados possuem cargas iguais. Assim, como não há mudança na carga elétrica da proteína, também não há mudança da mobilidade dela no gel de eletroforese. Portanto, proteínas com sequências diferentes de aminoácidos vão apresentar um padrão igual de bandas (SILVA, 2009; SOLFERINI & SELIVON, 2012).



Por fim, uma vez que as proteínas não são diretamente originadas do DNA, mas sim do RNA mensageiro, e que esse sofre um processamento que elimina partes que não codificam nada, os chamados introns, pode-se dizer que a variação presente nessas porções não codificantes do DNA também não é amostrada na eletroforese de aloenzimas (RICHARDSON *et al.*, 1986). A partir disso, a conclusão a que se chega é de que a técnica é capaz de fornecer apenas uma subestimativa da variação gênica presente no genoma, ou seja, a variação perceptível pela técnica de eletroforese é, muito certamente, menor do que aquela que está presente no código genético (SILVA, 2009).

A partir da década de 1970, muito pelas limitações da eletroforese de aloenzimas, passou-se a usar a recém desenvolvida técnica de sequenciamento de DNA, desenvolvida, em 1975, por Frederick Sanger (1918-2013), o que possibilitou o acesso mais direto à variação gênica presente no código genético (SANGER & COULSON, 1975). Na década de 1980 surgiu a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (ou PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida, em 1983, por Kary Mullis, o que tornou possível, para um grande número de laboratórios, trabalhar com variação em DNA. A PCR é realizada em uma máquina chamada termociclador, que assim se chama porque repete vários ciclos de temperaturas diferentes que servem para, em última análise, dar origem a uma grande quantidade de cópias de DNA a partir de uma fita dupla original (SAIKI *et al.*, 1988). Contudo, apesar das novas técnicas proporcionarem um acesso mais direto à variação presente no código genético do que as aloenzimas, elas ainda representam estimativas indiretas da variação gênica, uma vez que assumem, por exemplo, que o DNA que está sendo amplificado é aquele que se deseja e que todos os alelos estão sendo amplificados igualmente e corretamente (SILVA, 2009; SOLÉ-CAVA, 2001).

Atualmente, as técnicas que permitem medir a variação gênica têm sofrido uma revolução com os sequenciadores de nova geração ou NGS (*New Generation Sequencers*, do inglês). Nestas novas tecnologias, o sequenciamento de DNA é promovido em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases com grande economia de tempo e custo (CARVALHO & SILVA, 2010).

Uma vez disponíveis diversas técnicas para amostragem da variação gênica presente nas populações naturais e de posse dos aparatos teóricos da genética de populações, os problemas com os quais a genética marinha trabalha podem, enfim, ser

estudados. Esses encontram-se nos mais diversos campos de conhecimento da biologia marinha, contudo, em última análise, pode-se dizer que todos servem ao mesmo objetivo, que seria o de caracterização da biodiversidade presente nos ambientes marinhos (SILVA & RUSSO, 2000). No caso de espécies de interesse comercial esse objetivo é especialmente relevante, uma vez que envolve a exploração racional dos recursos renováveis. O objeto de estudo desse trabalho envolve um problema dessa natureza, como descrito na próxima seção.

## **1.2 Genética de Populações de *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758**

### **1.2.1 Mundo**

Um dos usos da genética de populações na biologia marinha se dá no campo da biologia da pesca, no sentido de estimar os níveis de estruturação populacional e identificar unidades reprodutivas (ou estoques) dos recursos pesqueiros. Estudos dessa natureza são fundamentais para planos de manejo e medidas de conservação (WARD, 2000), uma vez que somente a partir deles é que pode ser realizada uma exploração racional dos recursos renováveis da pesca, prevenindo o esgotamento de seus estoques. O recurso pesqueiro objeto de estudo deste trabalho é o peixe marinho *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758, um predador de topo de cadeia que apresenta crescimento rápido e pode chegar a 2 metros de comprimento furcal e pesar até 30 kg com a idade de 3 anos. A espécie apresenta dimorfismo sexual, onde os machos adultos possuem uma pronunciada crista óssea na cabeça que é ausente nas fêmeas, e a maturidade sexual é atingida com cerca de 50 cm de comprimento furcal. *C. hippurus* é um peixe epipelágico com grande capacidade migratória que vive em latitudes tropicais e subtropicais de todos os oceanos (PALKO *et al.*, 1982), nos quais sua distribuição é limitada pela isoterma de 20°C (GIBBS & COLLETTE, 1959).

A espécie é bastante explorada pela pesca industrial, artesanal e esportiva em diversas partes do mundo (PALKO *et al.*, 1982; SAKAMOTO & KOJIMA, 1999; MORALES-NIM *et al.*, 1999; CIB, 2007; MARTÍNEZ-ORTIZ *et al.*, 2015; FAO, 2019), inclusive no Brasil (AMORIM *et al.*, 2011; NÓBREGA *et al.*, 2015), onde figura entre os principais recursos pesqueiros desembarcados no estado do Rio de Janeiro. Entre os anos de 2011 e 2017 apresentou uma média de 1,7% do total da produção

pesqueira marinha do estado (Tabela 1; FIPERJ, 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; PMAP-RJ, 2018).

**Tabela 1.** Estatística pesqueira para o estado do Rio de Janeiro com ênfase na produção de *Coryphaena hippurus* entre os anos de 2011 e 2017.

ANO	PRODUÇÃO TOTAL DE PESCADO (t)	PRODUÇÃO DE <i>C. hippurus</i> (t)	VALOR PERCENTUAL (%)	POSICIONAMENTO NO RANKING DOS RECURSOS MAIS DESEMBARCADOS
2011	78.991,33	1.839,47	2,3	6º lugar
2012	90.688,59	1.680,80	1,9	5º lugar
2013	77.168,91	649,31	0,8	10º lugar
2014	76.524,28	854,73	1,1	7º lugar
2015	60.683,81	405,46	0,7	7º lugar
2016 <sup>1</sup>	368,85	48,91	13,3	1º lugar
2017 <sup>2</sup>	26.704,95	890,92	3,3	5º lugar

t = tonelada

<sup>1</sup> O ano de 2016 refere-se, praticamente, apenas ao monitoramento dos desembarques pesqueiros realizados no município de Macaé.

<sup>2</sup> Os dados de 2017 são referentes apenas ao 2º semestre do ano (entre julho e dezembro).

Diante desta grande pressão de pesca à qual a espécie está sujeita, uma das ferramentas que vêm sendo utilizadas na tentativa de delimitar os estoques de *Coryphaena hippurus* são os marcadores moleculares (ROSENBLATT & WAPLES, 1986; MERTEN *et al.*, 2015; MAROSO *et al.*, 2016; SACCO *et al.*, 2017). PLA & PUJOLAR (1999), por exemplo, fazendo uso de aloenzimas, demonstraram ausência de diferenças significativas entre amostras coletadas no Mar Mediterrâneo e no Atlântico Oriental, sugerindo a presença de uma única população na área. Contudo, DÍAZ-JAIMES *et al.* (2010), em um estudo filogeográfico global, usando o gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade I (NDI mtDNA), constataram diferenças significativas entre uma amostra proveniente do Mar Mediterrâneo e amostras oriundas dos outros oceanos, incluindo o Atlântico. Esse resultado foi confirmado por MAGGIO *et al.* (2018), usando o mesmo gene, e por SACCO *et al.* (2017) usando, além de NDI mtDNA, o loco da citocromo *c* oxidase subunidade I (COI). Quanto ao Mar Mediterrâneo, todas as evidências genéticas indicam a presença de uma única população

na área (PLA & PUJOLAR, 1999; MAROSO *et al.*, 2016; SACCO *et al.*, 2017; MAGGIO *et al.*, 2018).

Também no Oceano Atlântico, OXENFORD & HUNTE (1986) encontraram diferenças genéticas em marcadores de aloenzimas entre amostras coletadas no norte e no sul da região ocidental do Atlântico Central, sugerindo a presença de dois estoques distintos, o que, no entanto, não foi confirmado por MERTEN *et al.* (2015), que encontraram baixos níveis de diferenciação entre amostras coletadas na mesma região, através do gene mitocondrial NDI. Ainda no Atlântico, usando o mesmo gene, MAGGIO *et al.* (2018) sugeriram a presença de dois estoques distintos presentes na região, um no Atlântico Oriental e outro no Atlântico Ocidental.

Com relação ao Oceano Pacífico, DÍAZ-JAIMES *et al.* (2006), através do uso de marcadores moleculares de mtDNA (NDI), não foram capazes de demonstrar diferenças genéticas significativas entre amostras provenientes da costa oeste do México. Esse resultado, no entanto, não foi confirmado por ROCHA-OLIVARES *et al.* (2006), que analisando polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP) do mesmo gene mitocondrial, conseguiram observar diferenças gênicas significativas entre espécimes de *C. hippurus* coletados na mesma região, o que foi reafirmado por BOBADILLA-JIMÉNEZ (2007), usando marcadores de microssatélites. Contudo, TRIPP-VALDEZ *et al.* (2010), também fazendo uso de microssatélites, não foram capazes de rejeitar a hipótese nula de panmixia para amostras da espécie coletadas no Golfo da Califórnia, o que concorda com os resultados obtidos por DÍAZ-JAIMES *et al.* (2006). Ainda em relação aos estudos realizados no Oceano Pacífico, contudo, não mais em relação à costa oeste mexicana, CAETANO-NUNES (2013), através de mtDNA (NDI), observou a presença de duas populações de *C. hippurus* na Colômbia. Ademais, TING (2014) não observou diferenças significativas entre espécimes oriundos de Taiwan, das Ilhas Guam e do Havaí, usando também o gene NDI e a região controle do DNA mitocondrial. Com relação à costa do Peru, GOZZER-WUEST (2015), utilizando microssatélites, percebeu a existência de duas populações do recurso pesqueiro na área amostrada.

Além das questões relacionadas à estrutura de populações, questões sistemáticas também têm sido investigadas no gênero *Coryphaena*. PUJOLAR & PLA (2002), por exemplo, identificaram, com base em aloenzimas, a ocorrência de duas espécies

congêneres nas Ilhas Canárias (*C. hippurus* e *C. equiselis*), uma das quais (*C. equiselis*) era reconhecida como juvenil de *C. hippurus* no local. É nesse tipo de problema que está concentrada a pequena produção referente à espécie *C. hippurus* no Brasil.

### **1.2.2 Brasil**

Como mencionado anteriormente, a produção relacionada à espécie *C. hippurus* no Brasil é muito pequena, no que diz respeito a estudos sobre a genética de suas populações. MACEDO *et al.* (2014) investigaram a ocorrência de *Coryphaena equiselis* no litoral sul-sudeste através do gene mitocondrial citocromo *b*, não encontrando a presença da espécie nas amostras coletadas que eram compostas apenas de espécimes de *Coryphaena hippurus*. BONNER *et al.* (2017), fazendo uso de marcadores de aloenzimas, investigaram o *status* taxonômico de dois morfotipos da espécie na costa do Rio de Janeiro que são reconhecidos como dois recursos distintos pelos pescadores locais, sendo, inclusive, comercializadas a preços diferentes no mercado. Os resultados indicaram, contudo, que os morfotipos correspondiam apenas a diferentes estágios de vida de *C. hippurus*. Esses dois trabalhos (MACEDO *et al.*, 2014; BONNER *et al.*, 2017) são os únicos que foram realizados acerca da genética de populações da espécie para a costa brasileira.

Dessa forma, diante dos fatos de que (1) *Coryphaena hippurus* é uma espécie que sofre um grande esforço de pesca ao longo de sua distribuição geográfica, (2) de que há evidências de estruturação entre suas populações (ROCHA-OLIVARES *et al.*, 2006; BOBADILLA-JIMÉNEZ, 2007; DÍAZ-JAIMES *et al.*, 2010; CAETANO-NUNES, 2013; GOZZER-WUEST, 2015; SACCO *et al.*, 2017; MAGGIO *et al.*, 2018), e (3) frente à escassez de trabalhos sobre a genética de populações da espécie para a costa brasileira, o presente trabalho se propõe a descrever a variação gênica para um loco de microsatélite (*Chi002*; TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2010) para os dois morfotipos de *Coryphaena hippurus* previamente estudados por BONNER *et al.* (2017).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever a variação gênica de um loco de microssatélite (*Chi002*) em dois morfotipos comerciais (Dourado e Palombeta) da espécie *Coryphaena hippurus* (Actinopterygii: Coryphaenidae) na costa do estado do Rio de Janeiro.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Descrição da variação gênica a partir das frequências gênicas e genotípicas, heterozigosidade e testes da hipótese de Hardy-Weinberg;
- Inferir o grau de diferenciação entre os morfotipos a partir dos índices de fixação e identidades gênicas;
- Estimativa do número de populações genéticas presentes nas amostras a partir de análise Bayesiana.

### 3. MATERIAL E METÓDOS

#### 3.1 Amostragem e Área de Estudo

Amostras de músculo esquelético foram coletadas de 75 espécimes de *Coryphaena hippurus* obtidos através de desembarques pesqueiros realizados entre novembro de 2013 e abril de 2014 na região de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil). Os espécimes são reconhecidos pelos pescadores locais como pertencentes a dois recursos pesqueiros diferentes, correspondentes a um morfotipo maior (comprimento total médio de 126,07 cm, variando de 97 a 155 cm) que é denominado de Dourado e um morfotipo menor (comprimento total médio de 59,26 cm, variando de 42 a 81 cm) que é denominado de Palombeta (Figura 1). Dos 75 espécimes amostrados nesse trabalho, 28 pertencem ao morfotipo grande (Dourado), sendo 22 fêmeas e 6 machos, e 47 ao morfotipo pequeno (Palombeta), sendo 25 fêmeas, 20 machos e 2 espécimes de sexo não identificado.



**Figura 1.** Morfotipos de *Coryphaena hippurus*. (A) Morfotipo maior ou Dourado. (B) Morfotipo menor ou Palombeta.

A região de Cabo Frio é um dos diferentes pontos de desembarque de pescado contemplados pelo Programa de Monitoramento da Pesca do Estado do Rio de Janeiro, que visa o acompanhamento regular dos desembarques pesqueiros ao longo do litoral fluminense. O programa é desenvolvido pela Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), desde 2010, em parceria com o Laboratório de Biologia do Nécton e Ecologia Pesqueira (ECOPESCA-UFF).

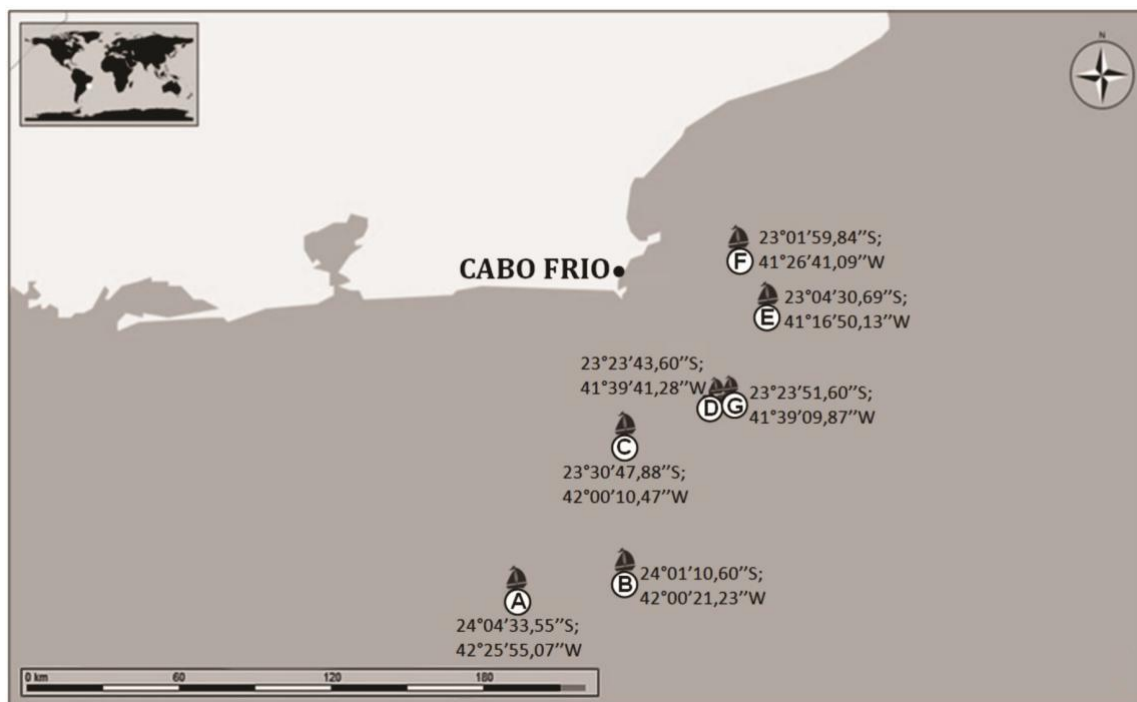
Os espécimes foram capturados por pescadores através da utilização de duas artes de pesca distintas, o espinhel de superfície, usado entre 60 e 160 metros de profundidade e a linha de mão, usada entre 60 e 140 metros de profundidade. Na Tabela 2 estão listadas as coordenadas geográficas dos pontos de captura dos espécimes amostrados e, na Figura 2, essas localidades são mostradas em um mapa da costa do Rio de Janeiro. A área amostrada equivale a 3.806 Km<sup>2</sup>, sendo a maior distância entre os pontos equivalente a 156 Km.

**Tabela 2.** Coordenadas geográficas dos pontos de captura de *Coryphaena hippurus*.

Ponto	Identificação	Latitude (S)	Longitude (W)
Cabo Norte	A	24° 04' 33,55''	42° 25' 55,07''
Sul do Cabo (ponto 1)	B	24° 01' 10,60''	42° 00' 21,23''
Sul do Cabo (ponto 2)	C	23° 30' 47,88''	42° 00' 10,47''
Sueste do Cabo Frio (ponto 1)	D	23° 23' 43,60''	41° 39' 41,28''
Leste do Cabo Frio (ponto 1)	E	23° 04' 30,69''	41° 16' 50,13''
Leste do Cabo Frio (ponto 2)	F	23° 01' 59,84''	41° 26' 41,09''
Sueste do Cabo Frio (ponto 2)	G	23° 23' 51,60''	41° 39' 09,87''

S = Sul; W = Oeste (do inglês *West*).





**Figura 2.** Mapa da região de Cabo Frio, com os pontos de captura de *Coryphaena hippurus* destacados (Fonte: BONNER *et al.*, 2017).

### 3.2 Extração e Amplificação de DNA

As 75 amostras tiveram seu DNA extraído pelo método de fenol-clorofórmio descrito por GREEN & SAMBROOK (2012) com pequenas modificações (maceração do músculo esquelético dos espécimes de *C. hippurus* com o uso de nitrogênio líquido). A técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) foi otimizada para um loco de microsatélite (Tabela 3; TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2010) e consistiu de um período de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de 55°C por 30s e mais 72°C por 30s, e um período de extensão final de 72°C por 10 min. As soluções de reação da PCR tiveram um volume total de 15 µl e consistiram de 6,5 µl de água miliQ, 1,5 µl de tampão 10X, 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,0 µl de dNTP (10mM de cada), 1,0 µl de cada *primer* (10 µM), 1,0 µl de *Uni-Taq DNA Polymerase* 5U/µl (Uniscience) e 1,0 µl do *template* (DNA dos espécimes).

**Tabela 3.** *Primers* referentes ao loco de microssatélite de *Coryphaena hippurus* utilizado neste trabalho (Fonte: TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2010).

Loco	Tamanho (bp)	Primers	Sequência	Chave de acesso
<i>Chi002</i>	104	F:GAAAAACTCACACGG TCACTTG R:GGCTTGCCAACCTGA GATTA	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>2</sub> CG(CA) <sub>3</sub>	AY135025

Os resultados da PCR foram conferidos por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 0,5X. As condições de corrida eletroforética foram 133V e 50mA por 70 minutos. O tamanho dos amplificadores foi estimado a partir do marcador de peso molecular 100bp *DNA Ladder RTU* (KASVI®). Os géis foram corados com GelRed® na proporção 1:10.000 e o padrão de bandas visualizado sob luz UV. Os resultados das eletroforeses foram registrados em um sistema de fotodocumentação (*Gel Doc™ EZ Imaging System*). A genotipagem dos indivíduos foi feita com o auxílio do *Image Lab™ Software* acoplado ao sistema de fotodocumentação.

### 3.3 Análise dos Dados

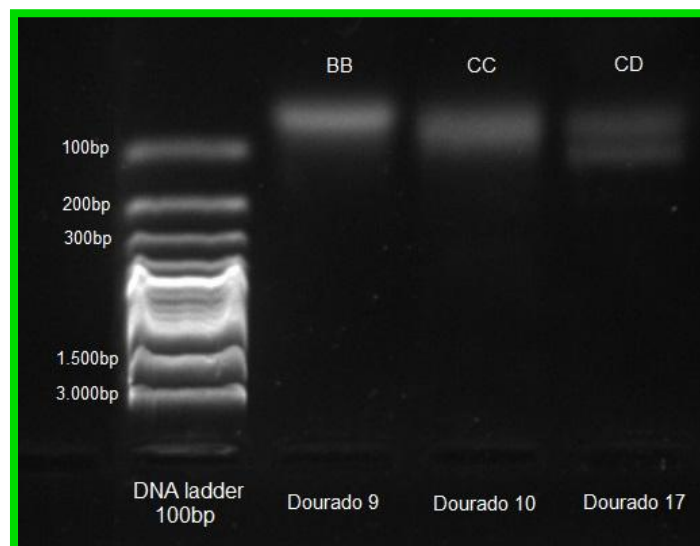
As frequências gênicas e genotípicas, heterozigosidade e testes da hipótese de Hardy-Weinberg para o loco *Chi002* foram calculadas para os dois morfotipos separadamente e também considerando Dourado e Palombeta como uma única amostra. Além disso, o grau de diferenciação entre os morfotipos foi estimado a partir dos índices de fixação de WEIR & COCKERHAM (1984) e das identidades gênicas de NEI (1972). Todas essas análises foram realizadas utilizando-se dos programas GENEPOP 4.2 (ROUSSET, 2008) e Fstat 2.9.3.2. (GOUDET, 2001). A significância dos índices de fixação de WEIR & COCKERHAM (1984),  $\theta$  e  $f$ , foi testada por qui-quadrado ( $\chi^2$ ) segundo WAPLES (1987).

Além das estimativas da genética de populações foi utilizada uma análise Bayesiana para inferir o número de populações presentes no conjunto de dados. Todos os indivíduos foram analisados utilizando  $5 \times 10^5$  iterações pelo método Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC), descartando as primeiras  $1 \times 10^5$  iterações como *burn-in*. Cada análise foi repetida 10 vezes para cada valor de  $K$  simulado, que variou

entre 1 a 10. A escolha da melhor estimativa do número de partições ( $K$ ) foi feita através do uso dos dados de  $\text{LnP(D)}$ . A análise Bayesiana foi realizada no programa Structure 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000).

#### 4. RESULTADOS

Foi encontrado um total de 4 alelos para o loco *Chi002* e a Figura 3 apresenta um exemplo de alguns dos genótipos observados. O alelo “b” foi o mais frequente para ambos os morfotipos e o alelo “a” o menos frequente.



**Figura 3.** Foto do gel de agarose (2,5%), corado com GelRed® e visualizado sob luz UV. Exemplos de espécimes que apresentaram resultados para o loco *Chi002* e seus respectivos genótipos: Dourado 9 (BB), Dourado 10 (CC) e Dourado 17 (CD).

Os resultados de frequências gênicas e heterozigosidades (observada e esperada) para cada um dos morfotipos estão descritos na Tabela 4. A identidade gênica entre os morfotipos apresentou um valor de 0,984, indicativo de grande similaridade entre eles. Resultado muito semelhante foi obtido com o índice de diferenciação presente entre as amostras ( $\theta$ ), que apresentou valor negativo ( $\theta = -0,003$ ) e, portanto, não significativo. Por outro lado, o índice de endocruzamento ( $f$ ) se apresentou altamente significativo ( $P=0,0007$ ). A hipótese de Hardy-Weinberg foi rejeitada para o morfotipo Dourado

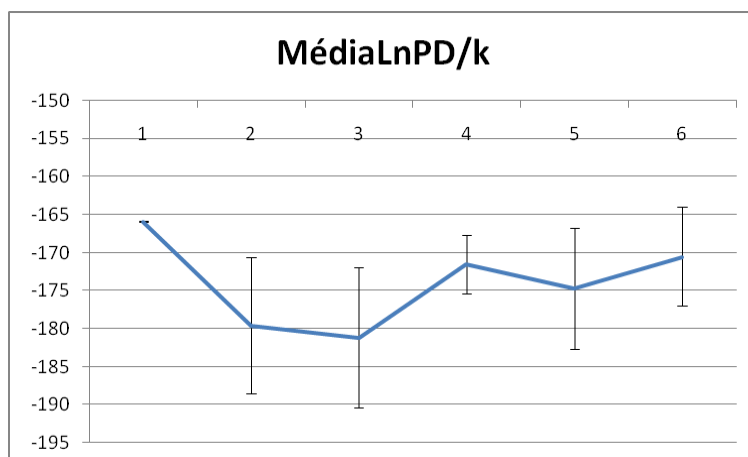
( $P=0,0008$ ) no sentido de um déficit de heterozigotos. Os valores encontrados para os índices de fixação e identidade gênica, bem como os valores de  $P$  para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg também se encontram descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados das principais estimativas de genética de populações para o loco *Chi002* nos dois morfotipos de *Coryphaena hippurus*. Onde: N = número de espécimes amostrados para cada morfotipo; a, b, c, d = frequência de cada um dos alelos amostrados;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F = índice de endocruzamento total; f = índice de endocruzamento dentro de cada morfotipo;  $\theta$  = índice de endocruzamento de cada morfotipo em relação ao total; I = identidade gênica (NEI, 1972).

	Dourado	Palombeta
<b>N</b>	28	47
<b>a</b>	0,036	0,053
<b>b</b>	0,625	0,511
<b>c</b>	0,250	0,277
<b>d</b>	0,089	0,160
<b><math>H_O</math></b>	0,286	0,489
<b><math>H_E</math></b>	0,552	0,643
<b>H-W</b>	0,0008	0,0896
<b>F</b>	0,319	
<b>f</b>	0,321*	
<b><math>\theta</math></b>	-0,003 <sup>NS</sup>	
<b>I</b>	0,984	

\* $P = 0,0007$ ; NS = Não significativo.

A análise Bayesiana mostrou que o maior valor de  $\text{LnP}(D)$  foi para  $K = 1$  (a média  $\text{LnP}(D)$  com base em 10 análises independentes foi igual a  $-165,9 \pm 0,094$ ), como pode ser observado na Figura 4. Esses resultados indicaram que para as amostras de *C. hippurus* analisadas não foi possível identificar nenhum grupo geneticamente diferenciado.



**Figura 4.** Resultado da análise Bayesiana. O maior valor médio de  $\text{LnP(D)}$  foi para  $K = 1$  ( $-165,9 \pm 0,094$ ; As barras representam os desvios padrão).

Diante dos resultados obtidos, Dourado e Palombeta também foram analisados juntos, como sendo apenas um grupo. As frequências gênicas e heterozigosidades (observada e esperada) obtidas para essa única amostra estão descritos na Tabela 5, bem como o resultado para o teste da hipótese de Hardy-Weinberg, que apresentou valor altamente significativo ( $P=0,0007$ ), rejeitando a hipótese nula de equilíbrio para essa amostra.

**Tabela 5.** Resultados obtidos ao analisar os morfotipos como um único grupo. Onde: N = número de espécimes amostrados; a, b, c, d = frequência de cada um dos alelos amostrados;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

<i>Coryphaena hippurus</i>	
<b>N</b>	75
<b>a</b>	0,047
<b>b</b>	0,553
<b>c</b>	0,267
<b>d</b>	0,133
<b><math>H_O</math></b>	0,413
<b><math>H_E</math></b>	0,608
<b>H-W</b>	0,0007

## 5. DISCUSSÃO

As amostras estudadas nesse trabalho são uma subamostra daquelas trabalhadas por BONNER *et al.* (2017) e, do mesmo modo que naquele trabalho, o índice de identidade gênica (I) de NEI (1972) foi alto, bem como foram obtidos valores baixos e não significativos de  $\theta$  (Tabela 6). A análise geral desses resultados somada aos resultados obtidos a partir da análise Bayesiana, que indicou ausência de grupos genéticos diferenciados na amostrada estudada, corrobora com a hipótese de que Dourado e Palombeta não representam unidades naturais. Muito provavelmente os dois morfotipos representam apenas diferentes estágios de vida de *Coryphaena hippurus*, como defendido por BONNER *et al.* (2017), sendo Palombeta a forma jovem da espécie e Dourado a forma adulta.

**Tabela 6.** Comparação entre os resultados observados em BONNER *et al.* (2017) e no presente trabalho. Onde: N = número de espécimes amostrados para cada morfotipo;  $N_A$  = número de alelos;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada; H-W = probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F = índice de endocruzamento total; f = índice de endocruzamento dentro de cada morfotipo;  $\theta$  = índice de endocruzamento de cada morfotipo em relação ao total; I = identidade gênica (NEI, 1972).

	BONNER <i>et al.</i> (2017)		PRESENTE TRABALHO	
	Dourado	Palombeta	Dourado	Palombeta
N	32	85	28	47
$N_A$	2,7 <sup>1</sup>	3,2 <sup>1</sup>	4	4
$H_O$	0,257 <sup>1</sup>	0,382 <sup>1</sup>	0,286	0,489
$H_E$	0,378 <sup>1</sup>	0,485 <sup>1</sup>	0,552	0,643
H-W	0,0000	0,0000	0,0008	0,0896
F	0,308 <sup>NS</sup>		0,319	
f	0,243 <sup>NS</sup>		0,321*	
$\theta$	0,087 <sup>NS</sup>		-0,003 <sup>NS</sup>	
I	0,922		0,984	

<sup>1</sup> Valores médios em relação a todos os locos amostrados.

\*P = 0,0007; NS = Não significativo.

Os resultados encontrados para número de alelos do loco *Chi002* diferiu daquilo que foi observado anteriormente em trabalhos que utilizaram esse loco de microsatélite para caracterizar a variação gênica de populações de *C. hippurus* (BOBADILLA-JIMÉNEZ, 2007; TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2010; GOZZER-WUEST, 2015). BOBADILLA-JIMÉNEZ (2007) encontraram de 6 a 11 alelos (média de 8,13) nas populações da espécie na costa oeste mexicana e números muito próximos a esses foram encontrados por TRIPP-VALDEZ *et al.* (2010) quando analisando populações do Golfo da Califórnia (número de alelos variando entre 6 e 14, com média de 10,17). Além disso, GOZZER-WUEST (2015) encontraram um número de alelos que variou entre 5 e 9 (média de 6,8) para amostras coletadas na costa do Peru. Essa divergência, no sentido de um menor número de alelos, pode ser explicada pelas seguintes hipóteses não mutuamente exclusivas: baixa variação gênica das populações da espécie na costa brasileira, presença de alelos nulos e/ou baixa resolução dos géis de agarose.

Dos dois estudos anteriores que foram realizados para a espécie na costa brasileira (MACEDO *et al.*, 2014; BONNER *et al.*, 2017), apenas um se preocupou em descrever a variação gênica presente nas populações amostradas (BONNER *et al.*, 2017). Nesse trabalho, os níveis de heterozigosidade encontrados para marcadores de aloenzimas não diferiram muito dos níveis encontrados aqui para o loco de microsatélite estudado (Tabela 6). Contudo, estudos que compararam os níveis de variação gênica de marcadores moleculares de aloenzimas e microsatélites encontraram, geralmente, níveis de variação gênica mais elevados para marcadores de microsatélites (BARKER *et al.*, 1997a; BARKER *et al.*, 1997b; ALLENDORF & SEEB, 2000; DUFRESNE *et al.*, 2002; ASTANEI *et al.*, 2005; GOSLING *et al.*, 2008). Tal tipo de resultado é esperado, uma vez que microsatélites apresentam uma taxa de evolução mais rápida do que aloenzimas (GOSLING *et al.*, 2008). BONNER *et al.* (2017) relataram que os níveis de variação gênica estimados em seu trabalho foram altos quando comparados com outros trabalhos realizados com peixes utilizando aloenzimas como marcador molecular. Dessa forma, é pouco provável que os resultados observados aqui para o loco *Chi002* sejam devidos a uma suposta baixa variação gênica presente nas populações de *Coryphaena hippurus* da costa brasileira.



Alelos nulos são aqueles que, na PCR, não são amplificados em níveis de detecção. Isso pode acontecer devido a mutações que ocorrem na região da sequência do DNA onde os *primers* se ligam ou, alternativamente, devido ao fato que alelos de sequências mais curtas são mais facilmente amplificados do que alelos de sequências mais longas, o que pode acarretar que nos indivíduos heterozigotos a detecção se dê preferencialmente para as sequências mais curtas (DAKIN & AVISE, 2004). A presença de alelos nulos já foi relatada em diversos estudos realizados com microssatélites (DAKIN & AVISE, 2004; ASTANEI *et al.*, 2005; KELLY *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2019), inclusive em um trabalho utilizando o loco *Chi002* com a espécie *C. hippurus*, (GOZZER-WUEST, 2015). Dessa forma, a hipótese da presença de alelos nulos não pode ser descartada como uma possível explicação para o baixo número de alelos amostrado no presente trabalho.

Os trabalhos realizados para as populações de *C. hippurus* com microssatélites (BOBADILLA-JIMÉNEZ, 2007; TRIPP-VALDEZ *et al.*, 2010; GOZZER-WUEST, 2015) utilizaram como suporte para eletroforese a poliacrilamida que, geralmente, apresenta uma melhor resolução dos fragmentos de DNA em relação à agarose (CORONADO *et al.*, 2009). Isso é particularmente verdade para locos de microssatélites que apresentam repetições de apenas dois pares de bases em suas sequências, como é o caso do loco *Chi002* (SENIOR *et al.*, 1998). Mais que isso, comparações entre o poder de resolução dos géis de poliacrilamida em relação aos de agarose, já foram realizados (CORONADO *et al.*, 2009). BRANDES *et al.* (2009), por exemplo, trabalhando com milho, foram capazes de demonstrar que apenas em 15,2% dos casos os géis de agarose recuperavam a mesma variação de alelos de microssatélites revelada pela poliacrilamida. Assim, da mesma forma que a hipótese de alelos nulos, a baixa resolução dos géis de agarose não pode ser excluída como uma explicação para o baixo número de alelos observado para o loco *Chi002* nesse trabalho.

A utilização da agarose para genotipagem de microssatélites, no entanto, encontra justificativa em alguns fatos. Primeiro, a agarose é um composto não tóxico, o que facilita a sua utilização em relação a géis de poliacrilamida que são neurotóxicos. Segundo, o custo dos géis de agarose é muito inferior aqueles de poliacrilamida (MORGANTE *et al.*, 2001; CORONADO *et al.*, 2009). Por fim, existem registros na literatura científica da utilização da agarose como suporte de eletroforese em trabalhos

que utilizam microssatélites (SENIOR *et al.*, 1998; XIA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2010; DIEKMANN *et al.*, 2012; GIRALDO *et al.*, 2012; COSSON *et al.*, 2014; BAILEY *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2015; BHATTARAI & MEHLENBACHER, 2017; BOHRA *et al.*, 2017; BHATTARAI & MEHLENBACHER, 2018; AUGUSTINOS *et al.*, 2018; SAKTHIPRIYA & SABU, 2018). Mais que isso, a consequência direta de uma possível baixa resolução da agarose para detecção dos alelos de microssatélites é uma subestimativa da variação gênica que leva a uma interpretação conservadora dos resultados. A opção de produzir interpretações conservadoras com relação à variação gênica amostrada por microssatélites pode ser justificada tanto com base em questões técnicas quanto teóricas.

As razões técnicas para se optar por registrar um número menor de alelos em vez de um número maior estão relacionadas à observação de bandas fantasmas (*stutter bands*) em microssatélites. *Stutter bands* são bandas menores do que o tamanho esperado que aparecem devido a erros na replicação do DNA durante a PCR (HOSSEINZADEH-COLAGAR *et al.*, 2016). O aparecimento dessas bandas ocasionam uma série de dificuldades e erros na interpretação dos resultados, sendo o erro mais comum uma superestimativa dos níveis de variação gênica (LADAS *et al.*, 2018). Por exemplo, TRIPP-VALDEZ *et al.* (2010) relataram o problema do aparecimento de *stutter bands* em seus resultados, principalmente em relação ao loco *Chi002*. Com relação às razões teóricas, elas estão relacionadas ao fato de que subestimativas de variação gênica diminuem o erro do tipo II, dificultando, dessa forma, a rejeição da hipótese nula. Quando se trabalha com hipóteses que dizem respeito a diferenças entre grupos, esse procedimento é preferível. Ou seja, é preferível dizer que duas coisas são iguais, quando elas são diferentes (Erro do tipo I), do que dizer que duas coisas são diferentes quando de fato elas são iguais (Erro do tipo II).

Por fim, resta discutir os testes para equilíbrio de Hardy-Weinberg que indicaram resultados significativos no sentido de um déficit de heterozigotos, tanto ao analisar os morfotipos separadamente, quanto ao ignorar a morfotipagem. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser explicado por uma das hipóteses não mutuamente exclusivas: (1) Seleção natural, (2) Deriva, (3) Ausência de panmixia e (4) Erros de genotipagem. Serão ignorados aqui os efeitos da mutação (com frequência muito baixa para produzir

efeitos relevantes no caso estudado) e migração (uma vez que se trata de uma espécie com alto poder migratório).

A hipótese de seleção natural é uma explicação muito pouco provável, uma vez que marcadores moleculares de microssatélites são considerados seletivamente neutros (SILVA, 2013). Contudo, BONNER *et al.* (2017) sugeriram no seu trabalho que um dos locos de aloenzimas amostrados (*Odh-1*) poderia estar sob seleção. Nesse caso, um desequilíbrio de ligação entre os locos *Odh-1* e *Chi002* poderia explicar os desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrados. Contudo, além dessa associação não ter sido testada, a explicação de seleção natural associado a desequilíbrio de ligação entre locos de marcadores moleculares distintos é muito pouco parcimoniosa. Dessa forma, a hipótese de seleção natural não se constitui numa boa explicação para o desequilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado.

Com relação à deriva genética, essa é uma força evolutiva que está diretamente relacionada aos tamanhos efetivos das populações, apresentando maior influência na mudança das frequências gênicas de populações pequenas, enquanto que em populações grandes apresenta influência bastante limitada. Populações de peixes marinhos com grande capacidade migratória apresentam tamanhos efetivos bastante elevados (ELY *et al.*, 2005), como é o caso de *Coryphaena hippurus* (DÍAZ-JAIMES *et al.*, 2010). Logo, os efeitos de deriva gênica parecem, também, uma explicação muito pouco provável para os resultados aqui apresentados.

Quanto à ausência de panmixia, do mesmo modo que na discussão sobre a deriva genética, esse seria um caso pouco provável já que a espécie é um peixe marinho com alta capacidade migratória. Contudo, o índice de endocruzamento ( $f$ ) se mostrou altamente significativo. Nesse sentido, a despeito de *Coryphaena hippurus* ser um peixe marinho que apresenta, provavelmente, grandes tamanhos populacionais, os cruzamentos podem não estar acontecendo ao acaso, mas seguindo algum tipo de cruzamento preferencial. De fato, existe na literatura observações nesse sentido que estão relacionadas ao dimorfismo sexual presente na espécie. Ao que tudo indica, o sistema de acasalamento de *C. hippurus* segue um padrão poligínico, onde machos maiores e que possuem cristas ósseas mais pronunciadas apresentam comportamento territorial de monopolização de grupos de fêmeas e defesa de seu território quanto a presença de machos menores (DUFFY, 2007). Dessa forma, a hipótese de ausência de panmixia por cruzamentos

preferenciais não pode ser rejeitada como explicação para o desequilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado. Por fim, a hipótese de erros de genotipagem já foi discutida com relação ao número de alelos observados e, embora ela não possa ser descartada, não existem boas evidências de que poderia, por si só, gerar o extenso déficit de heterozigotos observado.

## **6. CONCLUSÕES**

Em síntese, não foram encontradas evidências que corroborem que os morfotipos trabalhados sejam unidades naturais verdadeiras. Palombeta e Dourado parecem representar diferentes fases de vida de uma mesma espécie (jovens e adultos) conforme já sugerido anteriormente. Com relação aos níveis de variação gênica encontrados no presente trabalho, esses foram elevados, contudo, menores do que o observado para a espécie em outros trabalhos utilizando marcadores dessa natureza, o que pode ser explicado por problemas de genotipagem. Por fim, os desequilíbrios de Hardy-Weinberg observados podem ser explicados por duas hipóteses não mutuamente exclusivas, que são cruzamentos preferenciais na espécie e erros de genotipagem associados à interpretação conservadora dos resultados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F. W.; SEEB, L. W. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. **Evolution**, 54(2): 640–651, 2000.
- AMORIM, A. F.; ARFELLI, C. A.; DOMINGUES, R. R.; PIVA-SILVA, N.; MINTE-VERA, C. V. *Coryphaena hippurus* and *Acanthocybium solandri* incidental catch off South and Southeast Brazil (1971-2009) by São Paulo tuna longliners. **Collective Volume of Scientific Papers – ICCAT**, 66(5): 2140-2152, 2011.
- ASTANEI, I.; GOSLING, E.; WILSON, J.; POWELL, E. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). **Molecular Ecology**, 14: 1655-1666, 2005.
- AUGUSTINOS, A. A.; MEKI, I. K.; DEMIRBAS-UZEL, G.; OUÉDRAOGO, G. M. S.; SARIDAKI, A.; TSIAMIS, G.; PARKER, A. G.; ABD-ALLA, A. M. M.; BOURTZIS, K. Nuclear and *Wolbachia*-based multimarker approach for the rapid and accurate identification of tsetse species. **BMC Microbiology**, 18(1): 147, 2018.
- BAILEY, J., KARAOGLU, H., WELLINGS, C. R., & PARK, R. F. PCR-based simple sequence repeat markers for diagnostic identification of major clonal lineages of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and related stripe rust pathogens in Australia. **Australasian Plant Pathology**, 44(1): 97-103, 2015.
- BARKER, J. S. F.; MOORE, S. S.; HETZEL, D. J. S.; EVANS, D.; TAN, S. G.; BYRNE, K. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. **Animal Genetics**, 28: 103-115, 1997b.

- BARKER, J. S. F.; TAN, S. G.; SELVARAJ, O. S.; MUKHERJEE, T. K. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, 28: 1-13, 1997a.
- BHATTARAI, G., & MEHLENBACHER, S. A. Discovery, Characterization, and Linkage Mapping of Simple Sequence Repeat Markers In Hazelnut. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 143(5): 347-362, 2018.
- BHATTARAI, G.; MEHLENBACHER, S. A. In silico development and characterization of tri-nucleotide simple sequence repeat markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.). **PLoS ONE**, 12(5): e0178061, 2017.
- BOBADILLA-JIMÉNEZ, M. **Estructura genética del pez dorado (*Coryphaena hippurus*) en distintas escalas geográficas del Pacífico Nororiental**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Marinha) – Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada.
- BOHRA, A.; JHA, R.; PANDEY, G.; PATIL, P. G.; SAXENA, R. K.; SINGH, I. P.; SINGH, D.; MISHRA, R. K.; MISHRA, A.; SINGH, F.; VARSHNEY, R. K.; SINGH, N. P. New hypervariable SSR markers for diversity analysis, hybrid purity testing and trait mapping in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. **Frontiers in Plant Science**, 8: 377, 2017.
- BONNER, A.; DUARTE, M. R.; SOUZA, R. C. C. L.; MONTEIRO-NETO, C.; SILVA, E. P. Taxonomic status of two morphotypes of *Coryphaena hippurus* (Perciformes: Coryphaenidae). **Neotropical Ichthyology**, 15(1): e160102, 2017.
- BRANDES, C.; JOACHIMSTHALER, A.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; ZIMMERMANN, H. Genetic characterization of the origin of offtype plants in maize inbred lines. **Seed Science and Technology**, 37: 423-435, 2009.
- CAETANO-NUNES, B. R. **Caracterización Genética y Ambiental del Dorado (*Coryphaena hippurus* L.) en el Pacífico Colombiano**. 2013. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, 40(3): 735-744, 2010.

CIB (CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL PACÍFICO NORTE). **Evaluación biológico-pesquera del Dorado (*Coryphaena hippurus* y *C. equiselis*) en el Océano Pacífico. Región I.** Sonora: Centro de Investigaciones Biológicas del Pacífico Norte, 2007. 258 p.

CORONADO, A. C. M.; CORONADO, Y. M.; VILLARREAL, Y. C.; ARANA, A. C.; VÁSQUEZ, J. J.; RIVERA, O. J. M.; ARCOS, A. L.; AMARILES, H. D. V.; FLORES, J. E. M. Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. **Acta Agronómica**, 58(4): 234-244, 2009.

COSSON, P.; DECROOCQ, V.; REVERS, F. Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an *Arabidopsis* core collection. **Plant Methods**, 10(1): 2, 2014.

CRICK, F. H. C. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, 227: 561-563, 1970.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, 93: 504-509, 2004.

DÍAZ-JAIMES, P.; URIBE-ALCOCER, M.; ORTEGA-GARCÍA, S.; DURAND, J. D. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity of dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the eastern central Pacific. **Fisheries Research**, 80: 333-338, 2006.

DÍAZ-JAIMES, P.; URIBE-ALCOCER, M.; ROCHA-OLIVARES, A.; GARCÍA-DE-LEÓN, F. J.; NORTMOON, P.; DURAND, J. D. 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: 1209-1218, 2010.

DIEKMANN, K.; HODKINSON, T. R.; BARTH, S. New chloroplast microsatellite markers suitable for assessing genetic diversity of *Lolium perenne* and other related grass species. **Annals of Botany**, 110(6): 1327-1339, 2012.

DU, X. Y.; YI, S.; HUO, X. Y.; WANG, C.; LIU, D. F.; REN, W. Z.; CHEN, Z. W. Selecting representative microsatellite loci for genetic monitoring and analyzing genetic



structure of an outbred population of orange tabby cats in China. **Genetics and Molecular Research**, 14(1): 1788-1797, 2015.

DUFFY, L. **Sexual Development of Common Dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, and Fisheries Management Implications**. 2007. 30 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Marinha e Conservação) – Scripps Institution of Oceanography, Universidade da Califórnia, San Diego.

DUFRESNE, F.; BOURGET, E.; BERNATCHEZ, L. Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*?. **Molecular Ecology**, 11: 113-123, 2002.

ELY, B.; VIÑAS, J.; BREMER, J. R. A.; BLACK, D.; LUCAS, L.; COVELLO, K.; LABRIE, A. V.; THELEN, E. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **BMC Evolutionary Biology**, 5(1): 19, 2005.

FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura). 2019. **Species fact sheets: *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3130/en>>. Acesso em 03 jul. 2019.

FIPERJ (FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Diagnóstico da Pesca do Estado do Rio de Janeiro: Projeto de Monitoramento da Pesca no Estado do Rio de Janeiro – Estatística Pesqueira**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2013. 108 p.

FIPERJ (FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Relatório Final 2013**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2014. 146 p.

FIPERJ (FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Relatório Final 2014**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2015. 141 p.

FIPERJ (FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Relatório 2015**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2016. 174 p.

FIPERJ (FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Relatório Anual 2016**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2017. 180 p.

GARCIA, S. A. L., VAN DER LEE, T. A. J., FERREIRA, C. F., HEKKERT, B. T. L., ZAPATER, M. F., GOODWIN, S. B., GUZMÁN, M.; KEMA, G. H. J.; SOUZA JR., M. T. Variable number of tandem repeat markers in the genome sequence of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana (*Musa* spp). **Genetics and Molecular Research**, 9(4): 2207-2212, 2010.

GIBBS, R. H.; COLLETTE, B. B. On the identification, distribution and biology of the dolphins, *Coryphaena hippurus* and *C. equiselis*. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, 9: 117-152, 1959.

GIRALDO, P.; RODRÍGUEZ-QUIJANO, M.; VÁZQUEZ, J. F.; CARRILLO, J. M.; BENAVENTE, E. Validation of microsatellite markers for cytotype discrimination in the model grass *Brachypodium distachyon*. **Genome**, 55(7): 523-527, 2012.

GOSLING, E.; ASTANEI, I.; WAS, A. Genetic variability in Irish populations of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: discordant estimates of population differentiation from allozymes and microsatellites. **Freshwater Biology**, 53: 1303-1315, 2008.

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: 14 jun. 2019.

GOZZER-WUEST, R. **Diversidad genética y estructura poblacional del perico (*Coryphaena hippurus*, Linnaeus 1758) en el Pacífico Peruano**. 2015. 107 p. Tese (Doutorado em Engenharia Pesqueira) – Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Three-volume set**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 2028 p.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2016. 780 p.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HOSSEINZADEH-COLAGAR, A.; HAGHIGHATNIA, M. J.; AMIRI, Z.; MOHADJERANI, M.; TAFRIHI, M. Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. **Molecular Biology Research Communications**, 5(3): 167-174, 2016.

HUBBY, J. L.; LEWONTIN, R. C. 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: 577-594, 1966.

KELLY, A. C.; MATEUS-PINILLA, N. E.; DOUGLAS, M.; SHELTON, P.; NOVAKOFSKI, J. Microsatellites behaving badly: empirical evaluation of genotyping errors and subsequent impacts on population studies. **Genetics and Molecular Research**, 10(4): 2534-2553, 2011.

LADAS, I.; YU, F.; LEONG, K. W.; FITARELLI-KIEHL, M.; SONG, C.; ASHTAPUTRE, R.; KULKE, M.; MAMON, H.; MAKRIGIORGOS, G. M. Enhanced detection of microsatellite instability using pre-PCR elimination of wild-type DNA homo-polymers in tissue and liquid biopsies. **Nucleic Acids Research**, 46(12): e74-e74, 2018.

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. 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: 595-569, 1966.

MACEDO, K. T.; DE BIASI, J. B.; HILSDORF, A. W. S. Identificação molecular das espécies *Coryphaena hippurus* e *C. equiselis* oriundas da pesca comercial no litoral sul-sudeste do Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES, 17., 2014. Mogi das Cruzes. **Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica do PIBIC/UMC**. Bauru: Canal 6, 2014.

MAGGIO, T.; ALLEGRA, A.; ANDALORO, F.; BARREIROS, J. P.; BATTAGLIA, P.; BUTLER, C. M.; CUTTITA, A.; FONTES, M. R. J.; FREITAS, R.; GATT, M.; KARAKULAK, F. S.; MACIAS, D.; NICOSIA, A.; OXENFORD, H. A.; SABER, S.; RODRIGUES, N. V.; YILDIZ, T.; SINOPOLI, M. Historical separation and present-day structure of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) populations in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. **Ices Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, 76(1): doi:10.1093/icesjms/fsy174, 2018.

MAROSO, F.; FRANCH, R.; DALLA ROVERE, G.; ARCULEO, M.; BARGELLONI, L. RAD SNP markers as a tool for conservation of dolphinfish *Coryphaena hippurus* in the Mediterranean Sea: Identification of subtle genetic structure and assessment of populations sex-ratios. **Marine Genomics**, 28: 57-62, 2016.

MARTÍNEZ-ORTIZ, J.; AIRES-DA-SILVA, A. M.; LENNERT-CODY, C. E.; MAUNDER, M. N. The Ecuadorian artisanal fishery for large pelagics: species composition and spatio-temporal dynamics. **PLoS ONE**, 10(8): e0135136, 2015.

MERTEN, W. B.; SCHIZAS, N. V.; CRAIG, M. T.; APPELDOORN, R. S.; HAMMOND, D. L. Genetic structure and dispersal capabilities of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western central Atlantic. **Fishery Bulletin**, 113: 419-429, 2015.

MILLER, W. L.; EDSON, J.; PIETRANDREA, P.; MILLER-BUTTERWORTH, C.; WALTER, W. D. Identification and evaluation of a core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **BMC Genetics**, 20: 49, 2019.

MORALES-NIM, B.; DI STEFANO, M.; POTOSCHI, A.; MASSUT, E.; RIZZO, P.; GANCITANO, S. Differences between the sagitta, lapillus and vertebra in estimating age and growth in juvenile Mediterranean dolphinfish (*Coryphaena hippurus*). **Scientia Marina**, 63: 327-336, 1999.

MOREIRA, C. Código genético. **Revista Ciência Elementar**, 2(4): 251, 2014.

MOREIRA, C. Dogma Central da Biologia. **Revista Ciência Elementar**, 3(1): 055, 2015.

MOREIRA, C. Gene. **Revista Ciência Elementar**, 1(1): 052, 2013b.

MOREIRA, C. Genética. **Revista Ciência Elementar**, 1(1): 051, 2013a.

- MORGANTE, M.; PFEIFFER, A.; JURMAN, I.; PAGLIA, G.; OLIVIERI, A. M. PCR analysis of SSR polymorphisms in plant using agarose gels. *In*: KARP, A; ISAAC, P. G; INGRAM, D. S (eds.). **Molecular tools for screening biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 206-207.
- NEI, M. Genetic Distance between Populations. **American Naturalist**, 106(949): 283-292, 1972.
- NETO, J. L.; DUARTE, M. R.; SILVA, E. P. A genética e o mar. **Revista Ciência Elementar**, 7(1): 015, 2019.
- NÓBREGA, M. F.; KINAS, P. G.; LESSA, R.; FERRANDIS, E. Spatial and temporal variation in artisanal catches of dolphinfish *Coryphaena hippurus* off north-eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, 86(2): 785-804, 2015.
- OXENFORD, H. A.; HUNTE, W. A preliminary investigation of the stock structure of the dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the Western Central Atlantic. **Fishery Bulletin**, 84: 451-460, 1986.
- PALKO, J. B.; BEARDSLEY, G. L.; RICHARDS, W. J. Synopsis of the biological data on dolphin-fishes, *Coryphaena hippurus* Linnaeus and *Coryphaena equiselis* Linnaeus. **NOAA Technical Report NMFS Circular 443 – FAO Fisheries Synopsis**, 130: 1-28, 1982.
- PLA, C.; PUJOLAR, J. M. Genetic homogeneity of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western Mediterranean and eastern Atlantic. **Scientia Marina**, 63: 337-341, 1999.
- PMAP-RJ (PROJETO DE MONITORAMENTO DA ATIVIDADE PESQUEIRA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO). **Relatório Técnico Semestral – RTS-01**. Niterói: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 2018. 255 p.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155(2): 945-959, 2000.
- PUJOLAR, J. M.; PLA, C. 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(2): 339-343, 2002.

- RICHARDSON, B. J.; BAVERSTOCK, P. R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis – a handbook for animal systematics and population studies**. Sydney: Academic Press, 1986. 410 p.
- ROCHA-OLIVARES, A.; BOBADILLA-JIMÉNEZ, M.; ORTEGA-GARCÍA, S.; SAAVEDRA-SOTELO, N.; SANDOVAL-CASTILLO, J. R. Mitochondrial variability of dolphinfish *Coryphaena hippurus* populations in the Pacific Ocean. **Ciencias Marinas**, 32: 569-578, 2006.
- ROSENBLATT, R. H.; WAPLES, R. S. A genetic comparison of allopatric populations of shore fish species from the eastern and central Pacific Ocean: dispersal or vicariance?. **Copeia**, 2: 275-284, 1986.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, 8(1): 103-106, 2008.
- SACCO, F.; MARRONE, F.; BRUTTO, S. L.; BESBES, A.; NFATI, A.; GATT, M.; SABER, S.; FIORENTINO, F.; ARCULEO, M. The Mediterranean Sea hosts endemic haplotypes and a distinct population of the dolphinfish *Coryphaena hippurus* Linnaeus, 1758 (Perciformes, Coryphaenidae). **Fisheries Research**, 186: 151-158, 2017.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1988.
- SAKAMOTO, R.; KOJIMA, S. Review of dolphinfish biological and fishing data in Japanese waters. **Scientia Marina**, 63: 375-385, 1999.
- SAKTHIPRIYA, M.; SABU, K. K. Development and Cross-Genera Transferability of Ginger EST-SSR Markers for Cardamom. **Current Bioinformatics**, 13(1): 95-99, 2018.
- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, 94: 441-448, 1975.
- SCHMIDT, J. Racial studies in fishes. I. Statistical investigations with *Zoarcus viviparus*. **Journal of Genetics**, 7(2): 105-118, 1918.

- SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, 38: 1088-1098, 1998.
- SILVA, E. P. A short history of evolutionary theory. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, 8(3): 671-687, 2001.
- SILVA, E. P. 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**. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 303-316.
- SILVA, E. P. Genética Marinha. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A (eds.). **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. p. 49-69.
- SILVA, E. P.; RUSSO, C. A. M. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. **Hydrobiologia**, 420: 119-135, 2000.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *In*: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. (eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 172-192.
- SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismos de isozimas. *In*: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. (eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. p. 165-170.
- SONG, Q., JIA, G., ZHU, Y., GRANT, D., NELSON, R. T., HWANG, E. Y., HYTEN, D. L.; CREGAN, P. B. Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR\_1.0) in soybean. **Crop Science**, 50(5): 1950-1960, 2010.
- TING, C. **Population Genetic Structure of *Coryphaena hippurus* from the Waters off Taiwan Based on NADH 1 and Control Region Sequences of mtDNA**. 2014. 54 p. Dissertação – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Nacional Sun Yat-sen, Kaohsiung.
- TRIPP-VALDEZ, M. A.; DE LEÓN, F. J. G.; ORTEGA-GARCÍA, S.; LLUCH-COTA, D.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; CRUZ, P. Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite loci. **Fisheries Research**, 105(3): 172-177, 2010.

WAPLES, R. S. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. **Evolution**, 41: 385-400, 1987.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, 420: 191-201, 2000.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19: 395-420, 1984.

XIA, X. C.; REIF, J. C.; HOISINGTON, D. A.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.;  
WARBURTON M. L. Genetic Diversity among CIMMYT Maize Inbred Lines  
Investigated with SSR Markers: I. Lowland Tropical Maize. **Crop Science**, 44: 2230-  
2237, 2004.



## **8. APÊNDICES**

## A genética e o mar

### CITAÇÃO

Neto, J. L., Duarte, M. R.,  
Silva, E. P. (2019)  
A genética e o mar,  
*Rev. Ciência Elem.*, V7(01):015  
[doi.org/10.24927/rce2019.015](https://doi.org/10.24927/rce2019.015)

### EDITOR

José Ferreira Gomes,  
Universidade do Porto

### EDITOR CONVIDADO

Paulo Ribeiro-Claro,  
Universidade de Aveiro

### RECEBIDO EM

25 de julho de 2018

### ACEITE EM

18 de janeiro de 2019

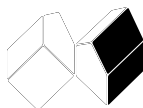
### PUBLICADO EM

12 de março de 2019

### COPYRIGHT

© Casa das Ciências 2019.  
Este artigo é de acesso livre,  
distribuído sob licença Creative  
Commons com a designação  
[CC-BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), que permite  
a utilização e a partilha para fins  
não comerciais, desde que citado  
o autor e a fonte original do artigo.

[rce.casadasciencias.org](http://rce.casadasciencias.org)



Jéssica Lopes Neto<sup>\*,†</sup>, Michelle Rezende Duarte<sup>†</sup>, Edson Pereira da Silva<sup>+</sup>

<sup>+</sup> DBM, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense

<sup>†</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros, Universidade Federal Fluminense

<sup>\*</sup>[jessicaln@id.uff.br](mailto:jessicaln@id.uff.br)

**A genética marinha é um campo interdisciplinar da biologia que se dedica ao estudo da genética dos organismos marinhos sob uma perspectiva populacional, evolutiva e ecológica, integrando conhecimentos da genética de populações, biologia molecular e biologia marinha.**

Entende-se por genética a ciência que estuda os fatores hereditários (ou genes) dos indivíduos e as leis que governam sua transmissão de geração para geração<sup>1</sup>. A constituição genética dos indivíduos pode ser definida como o conjunto de genes (ou genótipos ou alelos) que um indivíduo possui, sendo os genes a unidade funcional da hereditariedade<sup>2</sup>. Quando o interesse é pela mudança na constituição genética dos grupos de indivíduos (as populações) ao longo do tempo, se está estudando genética de populações. Ou seja, a genética de populações estuda como a proporção dos genes muda de uma geração para outra. Mais que isso, ela preocupa-se em entender o que determina que essas mudanças aconteçam. Pode-se dizer, então, que estudá-la é estudar o processo evolutivo<sup>6, 11, 12</sup>. Quando a produção de informações referentes à genética de populações diz respeito a populações naturais de organismos marinhos, entra-se no campo da genética marinha, que pode ser definida como a ciência que estuda a genética de populações de organismos marinhos utilizando-se de uma perspectiva evolutiva (pois trabalha com a mudança) e ecológica (uma vez que também leva em consideração os ambientes em que esses organismos vivem).

Há registros de estudos realizados no campo da genética marinha que datam desde a década de 1910, contudo, em seu início, essa área de conhecimento possuía uma aplicação bastante restrita, visto que enfrentava problemas de ordem prática no que dizia respeito aos tipos de organismos marinhos que podiam ser estudados. Isso se devia em grande parte ao fato de que para se estudar genética de populações era necessário manter as populações estudadas em cultivos laboratoriais de modo que fosse possível a realização de cruzamentos controlados. No caso de espécies marinhas, essa possibilidade era muito limitada. Por exemplo, não era possível estudar organismos de grande porte e, naquele tempo, o cultivo da maioria das espécies marinhas não era viável. Assim, por conta dessas limitações, o desenvolvimento da genética marinha se deu de forma tardia no século XX.

Tal cenário de limitações sofreu uma mudança apenas no final da década de 1960, com a aplicação da técnica de eletroforese de aloenzimas ao estudo da constituição genética dos indivíduos nas populações naturais. As aloenzimas são proteínas que se comportam como diferentes alelos de um mesmo gene e a técnica consiste na separação dessas proteínas por meio da sua migração ao longo de um suporte (que pode ser um gel de amido, agarose ou poliacrilamida ou um papel, como o acetato de celulose) sob a ação de uma corrente elétrica <sup>2, 5</sup>. Depois que essas proteínas são separadas e coradas por processos bioquímicos elas apresentam um padrão de bandas que pode ser interpretado como os genótipos dos indivíduos, como mostrado na FIGURA 1. O fato de que o padrão de bandas de proteínas colorido em um gel pode ser interpretado como alelos advém do chamado “dogma central da biologia molecular” que diz que o DNA é transcrito em RNA e este, por sua vez, traduzido em proteínas (FIGURA 2) <sup>4</sup>. Assim, assume-se que amostrar a variação de aloenzimas é, também, amostrar variação do DNA <sup>4, 9</sup>. Com isso, estava sendo inaugurado o uso daquilo que chamamos de marcadores moleculares, que nada mais são que moléculas que representam genes com algum tipo de variação, de modo que podem ser usados para amostragem da constituição genética das populações naturais. As aloenzimas foram, portanto, o primeiro marcador molecular da história de uma ciência que estava nascendo naquele momento, a genética molecular.

Desde então, as espécies marinhas começaram a ser estudadas rotineiramente com o novo método, visto que não havia mais a necessidade do uso de cultivos laboratoriais e a realização de cruzamentos controlados para se estudar genética marinha. Em muitos casos, apenas uma amostra de tecido dos indivíduos era necessária para o estudo genético das populações desses organismos. Contudo, ainda que a eletroforese de aloenzimas seja usada amplamente, ela apresenta algumas limitações que precisam ser pontuadas. A primeira delas diz respeito a se assumir uma correspondência entre os genes e seus produtos (as proteínas). Ao passo que os aminoácidos são as unidades formadoras das cadeias proteicas, os nucleotídeos são as unidades formadoras dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). No código genético, trincas de nucleotídeos, conhecidas como códons, são as responsáveis por codificar os vinte aminoácidos principais que constituem as proteínas. Entretanto, o código genético possui a característica de ser degenerado, o que significa que diferentes códons podem codificar o mesmo aminoácido (FIGURA 2) <sup>3</sup>. Isso quer dizer que algumas mudanças de códons não vão acarretar mudança do aminoácido codificado. Desta forma, pode-se dizer que há casos em que ocorrem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA sem que ocorram mudanças na sequência de aminoácidos da proteína.

A segunda limitação da técnica refere-se à carga elétrica dos aminoácidos. Nessa circunstância, o que se dá é que a substituição de aminoácidos que acontece, ocorre sem mudar a carga, ou seja, os aminoácidos trocados possuem cargas iguais. Assim, como não há mudança na carga elétrica da proteína, também não há mudança da mobilidade dela no gel de eletroforese. Portanto, proteínas com sequências diferentes de aminoácidos vão apresentar um padrão igual de bandas.

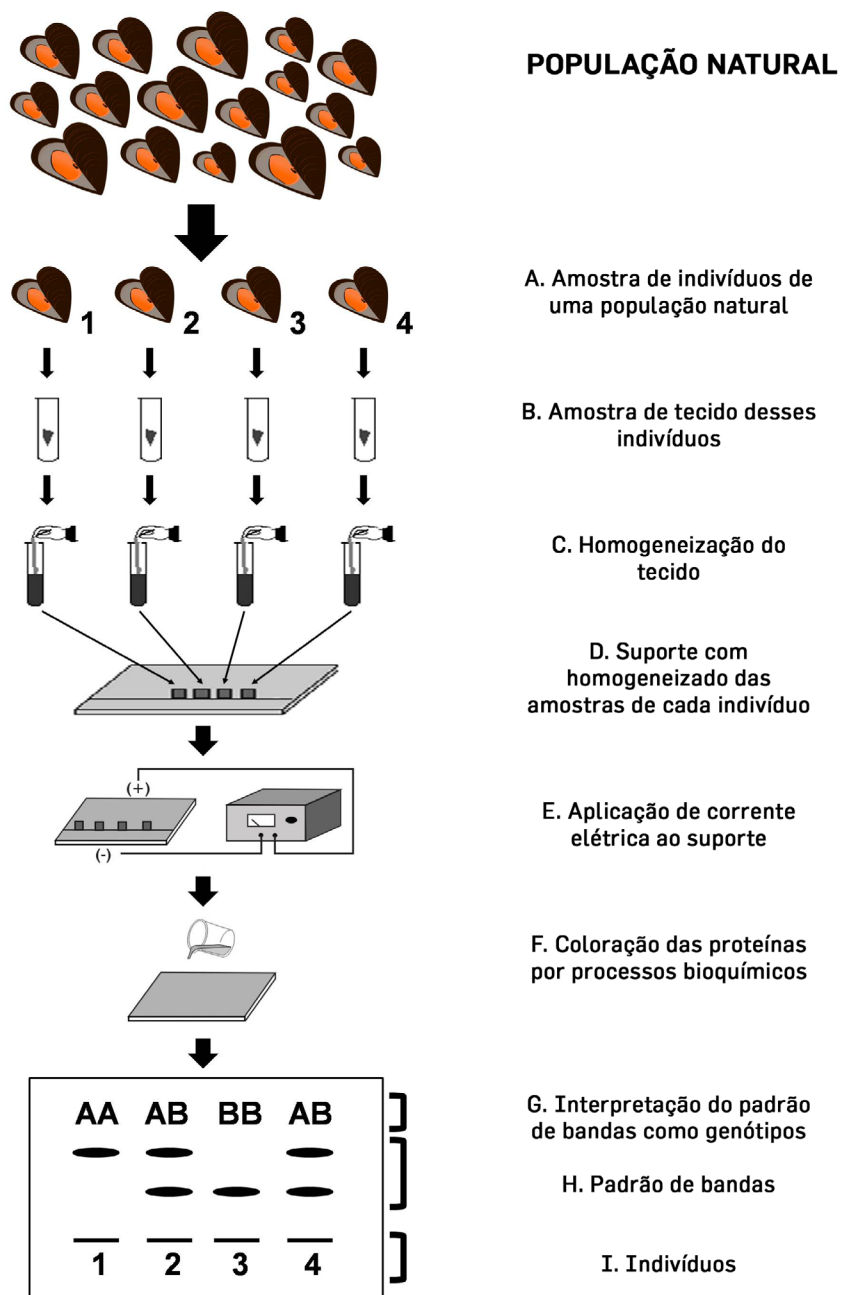
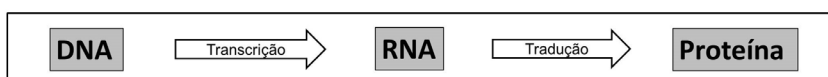


FIGURA 1. Eletroforese de aloenzimas. Depois de feita a amostragem de uma população natural (A), amostras de tecido dos indivíduos coletados são retiradas (B) e homogeneizadas (C) antes de serem aplicadas no material suporte da eletroforese (D). Feito isso, o suporte é submetido a uma corrente elétrica (E) que fará com que as proteínas migrem ao longo dele de maneira diferenciada em função de seu peso molecular e carga elétrica. Essas proteínas serão coloridas por processos bioquímicos (F), produzindo um padrão de bandas que pode ser interpretado como o genótipo dos organismos (G, H, I). Convencionalmente, a banda que percorreu o caminho mais longo no gel é considerada como o alelo A do gene em questão, e as bandas subsequentes são nomeadas seguindo a ordem alfabética.

Por fim, uma vez que as proteínas não são diretamente originadas do DNA, mas sim do RNA mensageiro, e que esse sofre um processamento que elimina partes que não codificam nada, os chamados introns, pode-se dizer que a variação presente nessas porções não codificantes do DNA também não é amostrada na eletroforese de aloenzimas. A partir disso, a conclusão a que se chega é de que a técnica é capaz de fornecer apenas uma subestimativa da variação gênica presente no genoma, ou seja, a variação perceptível pela técnica de eletroforese é, muito certamente, menor do que aquela que está presente no código genético <sup>11</sup>.

## A. O chamado "dogma central da biologia molecular".



## B. Código genético.

		SEGUNDO NUCLEOTÍDEO									
		U		C		A		G			
		Código	Aminoácido	Código	Aminoácido	Código	Aminoácido	Código	Aminoácido		
PRIMEIRO NUCLEOTÍDEO	U	UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteína	U	
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA		UCA		UAA		PARADA		UGA	PARADA
		UUG	UCG	UAG		PARADA	UGG	Triptofano	G		
	C	CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Histidina	CGU	Arginina	U	
		CUC		CCC		CAC		CGC		C	
		CUA		CCA		CAA		Glutamina		CGA	A
		CUG		CCG		CAG	CGG			G	
	A	AUU	Isoleucina	ACU	Trionina	AAU	Asparagina	AGU	Serina	U	
		AUC		ACC		AAC		AGC		C	
		AUA		ACA		AAA	Lisina	AGA	Arginina	A	
		AUG	Metionina	ACG		AAG		AGG		G	
	G	GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Ácido aspártico	GGU	Glicina	U	
		GUC		GCC		GAC		GGC		C	
		GUA		GCA		GAA		Ácido glutâmico		GGA	A
		GUG		GCG		GAG	GGG			G	

		TERCEIRO NUCLEOTÍDEO							
		C	G	A	U	C	G	A	U

FIGURA 2. Ilustração gráfica do chamado "dogma central da biologia molecular" que diz que o DNA é transcrito em RNA que é traduzido em proteínas (A) e tabela com as informações referentes à tradução do código genético em aminoácidos (B). Percebe-se que quase todos os aminoácidos são codificados por mais de uma trinca de nucleotídeos, com as únicas exceções sendo a metionina e o triptofano.

A partir da década de 1970, muito pelas limitações da eletroforese de aloenzimas, passou-se a usar a recém desenvolvida técnica de sequenciamento de DNA, desenvolvida, em 1975, por Frederick Sanger (1918-2013), o que possibilitou o acesso mais direto à variação gênica presente no código genético <sup>10</sup>. Na década de 1980 surgiu a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (ou PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) desenvolvida, em 1983, por Kary Mullis, o que tornou possível, para um grande número de laboratórios,

trabalhar com variação em DNA<sup>9</sup>. A PCR é realizada em uma máquina chamada termociclador, que assim se chama porque repete vários ciclos de temperaturas diferentes que servem para, em última análise, dar origem a uma grande quantidade de cópias de DNA a partir de uma fita dupla original (FIGURA 3). Atualmente, as técnicas que permitem medir a variação gênica têm sofrido uma revolução com os sequenciadores de nova geração ou NGS (New Generation Sequencers, do inglês). Nestas novas tecnologias o sequenciamento de DNA é promovido em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases com grande economia de tempo e custo. Apesar das novas técnicas proporcionarem um acesso mais direto à variação presente no código genético do que as aloenzimas, elas ainda representam estimativas indiretas da variação gênica, uma vez que assumem, por exemplo, que o DNA que está sendo amplificado é aquele que se deseja<sup>11, 14</sup>.

Explicado tudo isso, os problemas com os quais a genética marinha trabalha encontram-se nos mais diversos campos de conhecimento da biologia marinha, contudo, em última análise, pode-se dizer que todos servem ao mesmo objetivo, que seria a caracterização da biodiversidade presente nos ambientes marinhos. O uso da genética na biologia da pesca, por exemplo, relaciona-se à identificação de unidades reprodutivas (ou estoques) de um determinado recurso pesqueiro. A determinação de estoques pesqueiros é uma tarefa indispensável à conservação do recurso que está sob exploração, uma vez que dependendo do número e tamanho dos estoques as estratégias de conservação utilizadas serão diferentes. Assim, se for demonstrado pela genética marinha, que os indivíduos pertencentes a diferentes regiões pertencem a um mesmo estoque, todos aqueles que exploram tal recurso pesqueiro devem unir seus esforços de manejo de modo a promover a conservação daquela população. Por outro lado, se for observado que cada região possui um estoque diferente, o manejo deve se dar de forma separada, para evitar que os estoques sejam completamente esgotados.

Outro exemplo do uso da genética de populações na biologia marinha é nas áreas de taxonomia e sistemática, que são as ciências responsáveis pela classificação e organização dos seres vivos em grupos hierárquicos. Nesse caso, a genética marinha tem sido amplamente aplicada em estudos de identificação de espécies crípticas, que são aquelas espécies que apresentam características físicas muito semelhantes a ponto de serem confundidas entre si. Tais estudos permitem que essas espécies sejam corretamente classificadas, de modo a fornecer melhores informações a respeito da biodiversidade.

Sem a correta classificação das espécies presentes no ambiente marinho, a conservação e o manejo não podem ser realizados de maneira satisfatória. Variantes de uma mesma espécie que são considerados como pertencentes a espécies diferentes podem gerar esforços inúteis de manejo e conservação que poderiam ser empregados em espécies verdadeiramente distintas. Por outro lado, considerar espécies diferentes como pertencentes a um mesmo grupo nos planos de manejo pode levar à extinção de uma das espécies sem que nem sequer se tenha tido conhecimento sobre ela<sup>14</sup>. A metodologia de DNA *barcode* (sequenciamento do gene citocromo oxidase I-COI do DNA mitocondrial), tem sido utilizada para caracterizar molecularmente algumas espécies e, dessa forma, tem permitido ações de conservação que dependem de identificação precisa.

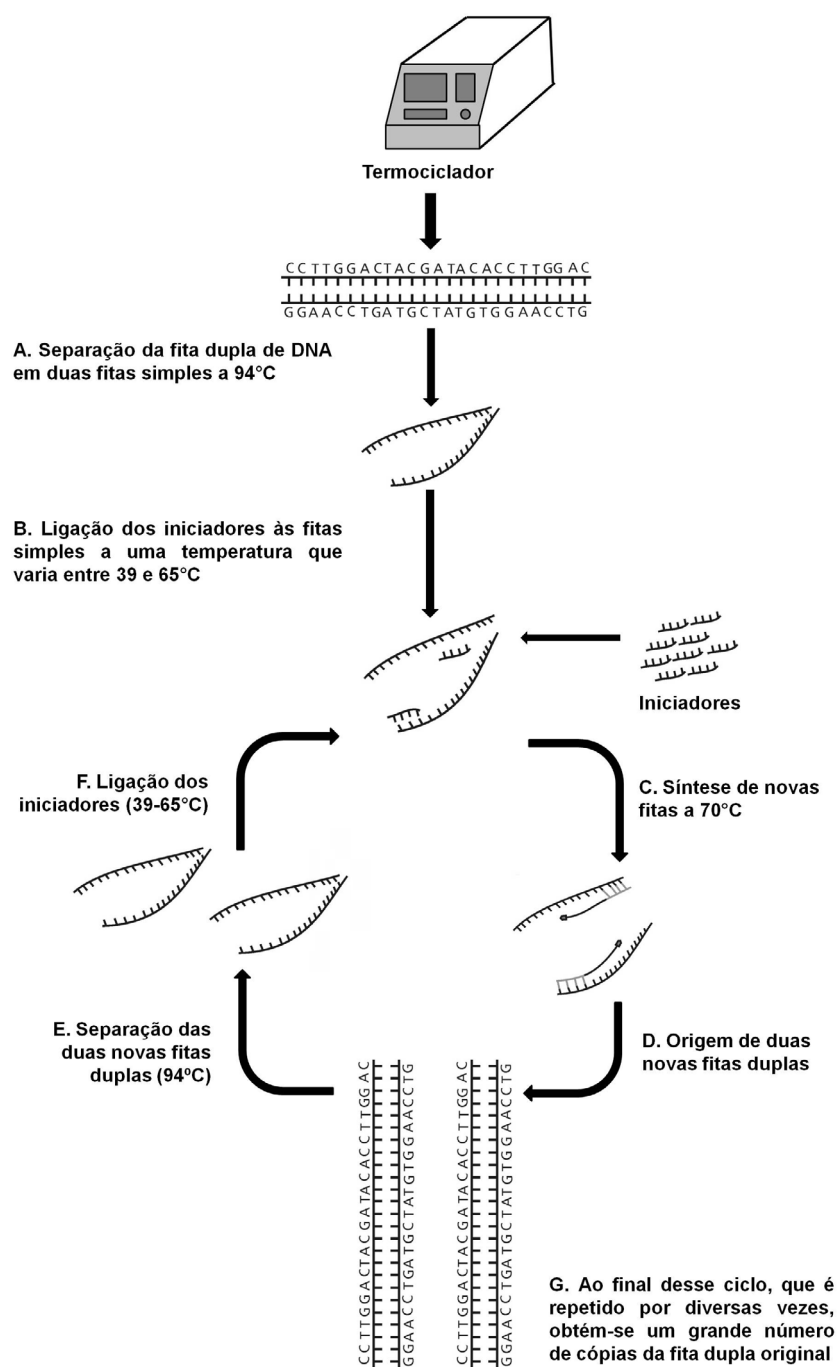


FIGURA 3. Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica consiste na amplificação do DNA através do uso de duas pequenas sequências de nucleotídeos, conhecidas como iniciadores, que são responsáveis por marcar os limites da porção da fita de DNA que será amplificada. A primeira temperatura utilizada no termociclador serve para separar a fita dupla da molécula de DNA em duas fitas simples que servirão como molde para os iniciadores (A). A segunda temperatura é aquela em que esses iniciadores irão se unir às fitas molde (B). Por fim, na terceira temperatura ocorre a síntese de novas fitas duplas de DNA a partir das fitas simples nas quais os iniciadores estão acoplados (C). Esse ciclo de temperaturas é repetido por diversas vezes de modo a produzir uma grande quantidade do DNA molde. Se ao final do primeiro ciclo são originadas duas fitas duplas a partir da fita dupla original de DNA (D), ao final do segundo ciclo serão produzidas quatro e assim sucessivamente (E, F, G) em escala exponencial.

A aplicação da genética marinha como ferramenta de estudo da biodiversidade também se dá em estudos sobre bioinvasão. As bioinvasões são a chegada e o estabelecimento de organismos não nativos em ambientes onde eles não ocorrem naturalmente, sendo um fenômeno que na maioria das vezes é mediado pela ação humana. Uma das consequências de uma bioinvasão é a alteração do ecossistema invadido, com possível perda da biodiversidade local e extinção de espécies nativas, o que gera consequências não só ecológicas, mas também sociais e econômicas. Dessa maneira, cada vez mais estudos têm sido realizados com o objetivo de entender como o processo de invasão acontece, e o uso da genética marinha tem se mostrado muito útil em diversos aspectos, como no reconhecimento das espécies invasoras quando elas são ainda muito jovens e não podem ser identificadas por métodos morfológicos; na diferenciação entre essas espécies e as nativas no caso de haver grande semelhança física entre elas; ou mesmo na inferência do local de origem dos organismos invasores. Tudo isso abre maiores possibilidades de controle do processo de bioinvasão <sup>1</sup>.

Os exemplos que foram dados representam apenas alguns poucos estudos nos quais a genética marinha tem sido utilizada como ferramenta metodológica, existindo ainda vários outros tipos de problemas que podem ser resolvidos com sua aplicação. Assim, essa ciência ultrapassa as fronteiras disciplinares, integrando conhecimentos de áreas diversas como a genética de populações no que se refere às suas teorias, a biologia molecular com relação às técnicas de que faz uso, e a biologia marinha no que diz respeito aos objetivos que persegue. Dessa forma, pode-se dizer que a genética marinha é uma ciência de caráter interdisciplinar <sup>11</sup>.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> LOPES, R.P., et al., *A Genética e as invasões biológicas: dois estudos de caso de bivalves invasores do Brasil*, *Genética na Escola*, 9(2):86-91, 2014.
- <sup>2</sup> MOREIRA, C., *Alelo*, *Rev. Ciência Elem.*, V3(2):112, 2015.
- <sup>3</sup> MOREIRA, C., *Código genética*, *Rev. Ciência Elem.*, V2(4):251, 2014.
- <sup>4</sup> MOREIRA, C., *Dogma Central da Biologia*, *Rev. Ciência Elem.*, V3(1):055, 2015.
- <sup>5</sup> MOREIRA, C., *Eletroforese (Biologia)*, *Rev. Ciência Elem.*, V3(2):104, 2015.
- <sup>6</sup> MOREIRA, C., *Evolucionismo*, *Rev. Ciência Elem.*, V2(4):318, 2014.
- <sup>7</sup> MOREIRA, C., *Gene*, *Rev. Ciência Elem.*, V1(1):052, 2013.
- <sup>8</sup> MOREIRA, C., *Genética*, *Rev. Ciência Elem.*, V1(1):051, 2013.
- <sup>9</sup> MOREIRA, C., *PCR*, *Rev. Ciência Elem.*, V2(4):243, 2014.
- <sup>10</sup> SANGER, F. & COULSON, A. R., *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*, *J. Mol. Biol.*, 94: 441-448., 1975.
- <sup>11</sup> SILVA, E.P., *Genética Marinha*. In: *Biologia Marinha*. 2ed. Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (eds.). Editora Interciência, Rio de Janeiro, p. 49-69, 2009.
- <sup>12</sup> SILVA, E.P., *A short history of evolutionary theory*. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 8(3):671-687, 2001.
- <sup>13</sup> SOLFERINI, V.N. & SELIVON, D., Polimorfismos de isozimas. In: *Biologia Molecular e Evolução*. 2ed. Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. (eds.). Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 165-170, 2012.
- <sup>14</sup> SOLÉ-CAVA, A.M., *Biodiversidade molecular e genética da conservação*. In: *Biologia Molecular e Evolução*. Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. (eds.). Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 172-192, 2001.