



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA AMBIENTAL



RAIMUNDO DARLEY FIGUEIREDO DA SILVA

**ANÁLISES POPULACIONAIS EM *Lutjanus purpureus* (POEY, 1866) DA
COSTA ATLÂNTICA OCIDENTAL A PARTIR DE MARCADORES
MOLECULARES**

BRAGANÇA

2015

RAIMUNDO DARLEY FIGUEIREDO DA SILVA

**ANÁLISES POPULACIONAIS EM *Lutjanus purpureus* (POEY, 1866) DA
COSTA ATLÂNTICA OCIDENTAL A PARTIR DE MARCADORES
MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental da Universidade Federal do Pará - Instituto de Estudos Costeiros, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Horacio Schneider

Co-orientadora: Prof. Dr^a Grazielle Fernanda Evangelista Gomes

BRAGANÇA

2015

RAIMUNDO DARLEY FIGUEIREDO DA SILVA

**ANÁLISES POPULACIONAIS EM *Lutjanus purpureus* (POEY, 1866) DA
COSTA ATLÂNTICA OCIDENTAL A PARTIR DE MARCADORES
MOLECULARES**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Horacio Schneider (Orientador)
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

Prof. Dr^a. Juliana Araripe Gomes da Silva (Titular)
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

Prof. Dr^a. Maria Iracilda da Cunha Sampaio (Titular)
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy (Titular)
UFRA, Campus de Capanema.

Prof. Dr. Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha (Suplente)
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

BRAGANÇA

2015

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 Introdução.....	9
1.1 A Família Lutjanidae.....	9
1.2. O gênero <i>Lutjanus</i>.....	10
1.3. A espécie <i>Lutjanus purpureus</i>.....	11
1.3.1 Morfologia Externa.....	12
1.3.2 Estratégia de vida e Biologia reprodutiva.....	13
1.4. Marcadores Moleculares e suas Aplicações.....	15
1.4.1 Estudos Genéticos com <i>L. purpureus</i>.....	17
1.5 Justificativa.....	19
1.6 Objetivo Geral.....	21
1.6.1 Objetivos Específicos.....	21
1.7 Referências Bibliográficas.....	22
Capítulo II - Desenvolvimento de Marcadores Intragênicos e Aplicabilidade em análises populacionais em Lutjanídeos (Perciformes).....	27
Capítulo III - Homogeneidade Genética de <i>Lutjanus purpureus</i> (Lutjanidae – Perciformes) do Atlântico Sul Ocidental a partir de análises multilocus.....	38
CONCLUSÕES.....	69
ANEXO I.....	70

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação apresenta-se estruturada em três capítulos. O primeiro deles aborda aspectos gerais sobre Lutjanidae e *Lutjanus purpureus*, assim como é apresentada uma breve revisão sobre a aplicação de marcadores em estudos de genética de populações e áreas afins.

O segundo capítulo é apresentado sob a forma de artigo científico, referindo-se ao desenvolvimento de iniciadores intragênicos para a aplicação em lutjanídeos e outros peixes marinhos. O capítulo III também é apresentado no formato de artigo científico, onde são abordadas questões inerentes à conectividade genética e demografia histórica de *L. purpureus* ao longo da Costa Brasileira.

RESUMO

Organismos marinhos com ampla distribuição são excelentes modelos para o entendimento de padrões de conectividade genética histórica. *Lutjanus purpureus*, ou pargo, como a espécie é popularmente conhecida, é um Teleósteo marinho pertencente à família Lutjanidae. A espécie distribui-se desde Cuba até o Nordeste do Brasil, sendo frequentemente encontrada sobre fundos rochosos e arenosos. Possui elevada importância econômica, no entanto poucos são os estudos disponíveis acerca da arquitetura genética da espécie. Dos principais objetivos do presente estudo, o primeiro trata do desenvolvimento e caracterização de iniciadores do tipo EPIC, para abordagens populacionais em *L. purpureus*, e outros teleósteos marinhos. A caracterização de regiões genômicas com polimorfismo suficiente para análises populacionais torna-se fundamental para estudos genéticos com múltiplas regiões não ligadas. Foram obtidos oito iniciadores, boa parte deles possuindo altos níveis de variação genética. Iniciadores EPIC possuem a vantagem de serem aplicáveis em um vasto nível taxonômico, assim estes iniciadores foram testados e amplificados em organismos de outros agrupamentos taxonômicos, portanto um indicativo de que podem ser usuais em abordagens intraespecíficas para vários grupos de peixes marinhos. O segundo objetivo principal foi avaliar questões sobre diversidade genética, demografia e conectividade genética histórica para *L. purpureus*, utilizando múltiplos *loci* (DNA mitocondrial e nuclear). Encontrou-se elevados índices de diversidade genética, provavelmente correlacionados a um elevado tamanho efetivo apresentado pela espécie. O pargo, aparentemente, demonstra elevados níveis de homogeneidade genética ao longo da região estudada, o que é coerente com traços biológicos da espécie tais como desova em mar aberto e desenvolvimento pelágico. Em relação a aspectos da demografia histórica, é apresentado um cenário de crescimento populacional, cujo início é datado de aproximadamente 170 mil anos, sendo esse período congruente com um período de máxima glacial para a região do Atlântico ocidental.

Palavras-chave: *Lutjanus purpureus*, íntrons, Marcadores moleculares, multilocus

ABSTRACT

Marine organisms with wide distribution are excellent models for the understanding of historical genetic connectivity patterns. *Lutjanus purpureus*, or Caribbean snapper, as the species is popularly known, is a marine Teleost belonging to the Family Lutjanidae. The species distribution is from Cuba to the Northeast of Brazil, being often found on rocky and sandy bottoms. It has high economic importance, however there are few studies available on the genetic architecture of the species. Of major goals of this study, the first deals with the development and characterization of the EPIC primers, for population approaches in *L. purpureus*, and others marine teleosts. The characterization of genomic regions with sufficient polymorphism to population analysis is fundamental for genetic studies with multiple unlinked regions. Were obtained eight primers, and the majority has high levels of genetic variation. EPIC primers have the advantage of being applicable on a wide taxonomic level, thereby these primers were tested and amplified in other taxonomic groups of organisms, so that an indication can be useful in various approaches to intraspecific groups of marine fish. The second main objective was to evaluate issues of genetic diversity, demographics and historical genetic connectivity for *L. purpureus* using multiple loci (mitochondrial and nuclear DNA). It was found high levels of genetic diversity, probably related to a high effective size presented by species. The Caribbean snapper apparently shows high levels of genetic homogeneity along of the study area, which is consistent with biological traits of species such as spawning in offshore and larval pelagic development. In relation to aspects of historical demography, a population growth scenario is presented, whose beginning is dated about 170,000 years, this period being congruent with a period of glacial maximum to the region of the western Atlantic.

Key- words: *Lutjanus purpureus*, introns, Molecular Markers, multilocus

Capítulo I

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Família Lutjanidae

A Família Lutjanidae é composta por peixes que possuem um corpo grande e alongado, coberto por escamas ctenóides, exceto na região do focinho, sendo esta uma das características distintivas em relação aos exemplares das demais famílias que ocorrem na mesma região (ANDERSON, 2003). Possuem a cabeça em formato triangular, quando observados lateralmente, com o perfil superior sendo mais inclinado que a porção inferior (MENEZES & FIGUEIREDO, 1980). O pré-opérculo é serrilhado e apresentam dentes no vômer e palato (ANDERSON, 2003). Na Figura 1 encontra-se um desenho esquemático de um exemplar típico da família Lutjanidae, destacando algumas dessas características.

Quanto a caracteres merísticos, a nadadeira dorsal possui normalmente de X- XII espinhos e 10-14 raios na posição posterior, podendo ser contínua ou levemente entalhada e a nadadeira anal é caracterizada pela presença de três espinhos e de sete a nove raios (ALLEN, 1985; MENEZES & FIGUEIREDO, 1980).

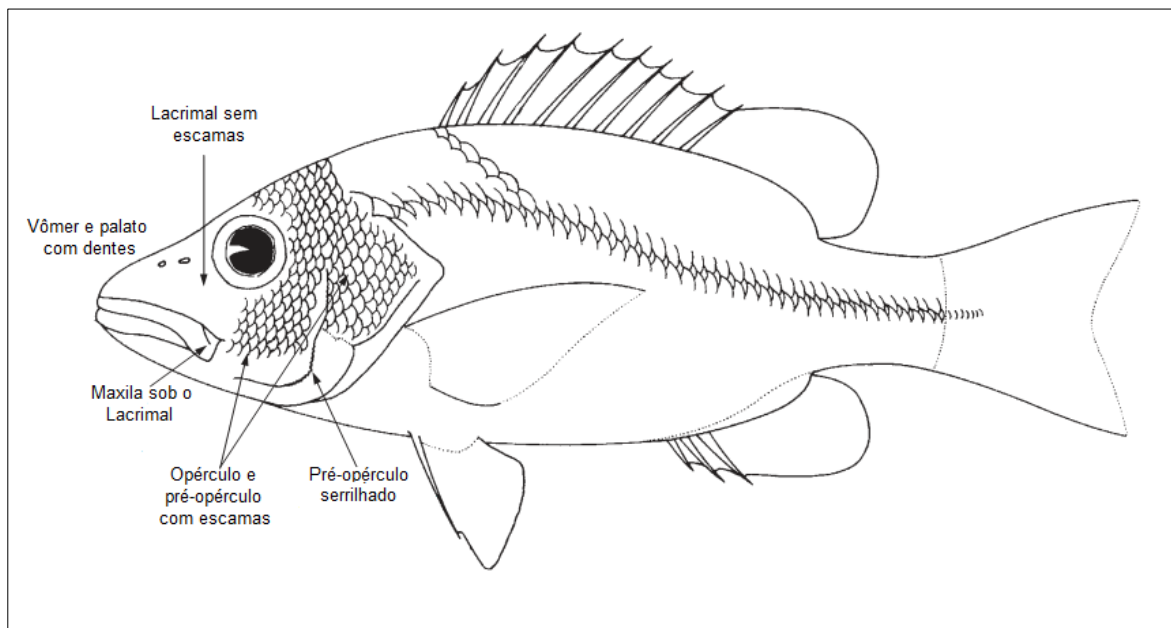


Figura 1. Desenho esquemático destacando a morfologia básica de um exemplar da família Lutjanidae . Modificado de Anderson (2003).

Os lutjanídeos ou pargos e/ou vermelhos, como estes são popularmente conhecidos, são dioicos e apresentam pouco ou nenhum dimorfismo sexual (NELSON, 2006). Geralmente habitam águas costeiras em regiões tropicais e subtropicais (ALLEN, 1985; MENEZES & FIGUEIREDO, 1980), com certo grau de associação ao fundo destes

ambientes. Existem ainda relatos de espécies que adentram estuários, normalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento, assim como algumas espécies que habitam ambientes de água doce (ALLEN, 1985; MENEZES & FIGUEIREDO, 1980; NELSON, 2006) e lagoas hipersalinas (ANDERSON, 2003).

Esta família é composta por aproximadamente 110 espécies (FROESE & PAULY, 2014), divididas nas seguintes subfamílias: Apsilinae, Paradicichthynae, Etelinae e Lutjaninae (NELSON, 2006). No entanto, dados moleculares vêm sugerindo a inclusão dos Caesioninae, dentro de Lutjanidae (BETANCUR-R et al., 2013; MILLER & CRIBB, 2007). Mesmo nas análises morfológicas existe compartilhamento de muitos caracteres entre os dois grupos (JOHNSON, 1980), porém, os “caesionídeos” apresentam uma gama de especializações tais como um rearranjo da maxila superior que permite que esta seja extremamente protrátil (uma adaptação para hábitos planctívoros de alimentação), além da alteração do formato corporal, que permite uma maior habilidade para a natação. Estas características contribuem para a classificação destes como um táxon a parte de Lutjanidae em estudos de morfologia, constituindo a família Caesionidae (JOHNSON, 1980).

No que se refere às relações filogenéticas entre as subfamílias, as análises morfológicas sugerem Etelinae como mais basal, já que esta apresenta alguns caracteres ancestrais, como a presença de um penúltimo raio nas nadadeiras dorsal e anal com um maior comprimento em relação ao último raio das mesmas (JOHNSON, 1980). Apsilinae seria intermediária e Lutjaninae e Paradicichthynae, as subfamílias mais derivadas, sendo Lutjaninae mais proximamente relacionada à Caesionidae. Lutjaninae destaca-se por conter a maior diversidade de táxons da família, aproximadamente 76 espécies (FROESE & PAULY, 2014), distribuídas em seis gêneros (NELSON, 2006), entre os quais está *Lutjanus* (Bloch 1790).

1.2. O gênero *Lutjanus*

O gênero é o mais diversificado de Lutjanidae, com cerca de 70 espécies (FROESE & PAULY, 2014). Seus representantes geralmente encontram-se em mares de regiões tropicais e subtropicais, normalmente associados a fundos rochosos ou arenosos, na maioria das vezes em profundidades entre 30- 40 metros, embora algumas espécies sejam encontradas em profundidades de até 200 metros (ALLEN, 1985).

São reconhecidos geralmente pelas seguintes características: perfis superiores e inferiores da cabeça de tamanhos desiguais, presença de algumas fileiras de escamas

horizontais abaixo da linha lateral, além da presença de osso pterigoide (caráter compartilhado com *Rhomboplites* e *Pinjalo*) (ALLEN, 1985).

Várias espécies pertencentes ao gênero possuem elevada importância econômica nas regiões onde ocorrem, tais como: *Lutjanus campechanus* (Poey 1860), *Lutjanus synagris* (L.), *Lutjanus analis* (Cuvier 1828) e *Lutjanus purpureus* (Poey 1866). Esta última, especialmente para a costa do Brasil, é reconhecida como um dos lutjanídeos mais capturados pela pesca extrativa marinha. Representa a espécie alvo do presente trabalho.

1.3. A espécie *Lutjanus purpureus*

Lutjanus purpureus ou pargo vermelho, como a espécie é popularmente conhecida, é um dos lutjanídeos mais explorados pela pesca extrativa na costa brasileira (MILOSLAVICH et al., 2011). A espécie encontra-se distribuída ao longo da costa atlântica Ocidental, desde Cuba até o Nordeste brasileiro, estado da Bahia (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993) (**Figura 2**). Alguns autores afirmam que esta distribuição se estende até o sudeste do Brasil (MENEZES & FIGUEIREDO, 1980; MOURA & LINDEMAN, 2007).

O pargo é uma espécie carnívora, com uma dieta constituída basicamente de peixes e crustáceos (ALLEN, 1985; FURTADO-OGAWA & MENEZES, 1972). Possui hábitos demersais sendo normalmente encontrado nos estratos entre 30 e 160 metros de profundidade (ALLEN, 1985).



Figura 2. Mapa representando a costa do Atlântico Ocidental com destaque para a área de distribuição da espécie *Lutjanus purpureus*, marcada em cinza. Baseado em Allen (1985) e Cervigón (1993).

1.3.1. Morfologia Externa

Os espécimes de *L. purpureus* (**Figura 3**) possuem o corpo róseo-avermelhado, com porções prateadas na região ventral (ALLEN, 1985; MENEZES & FIGUEIREDO, 1980), com as nadadeiras avermelhadas. Às vezes uma mancha negra está presente na base da nadadeira peitoral e os indivíduos jovens possuem ainda uma mancha enegrecida abaixo dos primeiros raios moles da nadadeira dorsal, característica compartilhada por outros membros do Gênero (ALLEN, 1985).



Figura 3. Exemplar adulto da espécie *Lutjanus purpureus*.

A nadadeira dorsal é composta por X espinhos e 14 raios (raramente nove espinhos e 15 raios); a nadadeira anal possui um perfil anguloso e contém três espinhos e oito raios, sendo que indivíduos apresentando nove raios são bastante frequentes (CERVIGÓN, 1993). A nadadeira peitoral é longa, alcançando o ânus e possuindo 17 raios (ALLEN, 1985).

Esta espécie possui uma acentuada similaridade morfológica com alguns lutjanídeos, tais como *Rhomboplites aurorubens* (Cuvier 1829) e *Lutjanus vivanus* (Cuvier 1828). A ausência de estrias oblíquas escuras na parte dorsal e a íris avermelhada, podem distingui-lo da espécie *L. vivanus* (RIVAS, 1966). Em relação a *R. aurorubens*, diferenças na contagem de espinhos na nadadeira dorsal discriminam as duas espécies (CERVIGÓN, 1993).

Existe ainda uma incerteza, quanto à existência de uma ou duas espécies de pargos vermelhos, *i. e.* *L. purpureus* e *Lutjanus campechanus* para o Atlântico Ocidental (ANDERSON, 1967), uma vez que estes lutjanídeos são proximamente relacionados, tanto morfológicamente (ANDERSON, 1967; CERVIGÓN, 1993) quanto geneticamente (GOMES et al., 2008; 2012), sugerindo que trata-se provavelmente de uma única espécie de pargo vermelho para a costa atlântica Ocidental, como já registrado para outras espécies de *Lutjanus* (CERVIGÓN, 1993).

1.3.2. Estratégia de vida e Biologia reprodutiva

Lutjanus purpureus é uma espécie que atinge grande porte, sendo já registrada a ocorrência de indivíduos com cerca de um metro (FONTELES-FILHO, 1970; GONZÁLEZ et al., 1998) e com longevidade máxima de 13 anos (GONZÁLEZ et al.,

1998) ou 18 anos de acordo com (ALLEN, 1985), sendo que a espécie possui uma acentuada taxa de crescimento durante o primeiro ano de desenvolvimento (até aproximadamente 28 cm), a partir desse momento o crescimento é desacelerado (GONZÁLEZ et al., 1998; GONZÁLEZ & ESLAVA, 1999). Ainda em relação às taxas de crescimento para *L. purpureus*, foram registradas diferenças entre indivíduos da Costa da Venezuela e do Nordeste brasileiro (GONZÁLEZ et al., 1998), os indivíduos do Brasil seriam menores em relação aos exemplares encontrados na costa venezuelana (GONZÁLEZ & ESLAVA, 1999), segundo os autores, estas diferenças estariam relacionadas às condições ambientais distintas nestas regiões.

Para a costa brasileira, a maturação sexual das fêmeas ocorre com o comprimento total médio de 43,5 cm (GESTEIRA & IVO, 1973), atingido quando os indivíduos alcançam em média seis anos (FONTELES- FILHO, 2000). O padrão reprodutivo do pargo é do tipo ovulíparo (i. e. fecundação e desenvolvimento externos), sendo que a desova ocorre mediante o emparelhamento entre macho e fêmea, porém sem contato direto, assim os gametas são liberados diretamente no ambiente (FONTELES- FILHO, 2000).

A desova é parcelada, ocorrendo um grande pico de liberação de gametas no final do primeiro trimestre e outro com menor intensidade em outubro (GESTEIRA & IVO, 1973), sendo que durante esse período os indivíduos realizariam migrações para águas de maior profundidade (IVO & HANSON, 1982), certamente uma estratégia para a redução da mortalidade durante as fases planctônicas, em decorrência da diminuição dos índices de predação (JOHANES, 1978).

Utilizando informações biológicas, como crescimento, época de desova e frequência de fêmeas maduras amostradas pela pesca comercial, Ivo & Hanson (1982), formularam duas hipóteses sobre o número de estoques de *L. purpureus* nas Costas Norte e Nordeste do Brasil, em relação à dinâmica de migração para desova. De acordo com o primeiro cenário, haveria duas classes de fêmeas com épocas distintas de desova, com o mesmo grupo de fêmeas desovando duas vezes ao ano nos bancos oceânicos. Assim a primeira classe de indivíduos originar-se-ia da desova realizada em março-abril e a segunda seria resultado da desova que ocorreria em outubro.

Em relação ao outro cenário, existiriam dois estoques, e estes seriam originados pela diferença em época de desova, com dois grupos de fêmeas desovando uma vez ao ano. O estoque 1 seria resultado de uma desova realizada nos bancos do Ceará em março- abril ou outubro e o estoque 2 seria resultante de desova realizada nos bancos de caiçara durante

os meses de outubro ou março- abril, sendo que em ambos os casos os indivíduos retornariam para as proximidades do Golfão Amazônico para a alimentação, pela ação de correntes superficiais, onde estariam sujeitos a intensa mistura (**Figura 4**). Dados moleculares já demonstraram a presença de um único estoque de pargo para a costa do Brasil, indicando a ausência de fidelidade de estoques a sítios específicos de reprodução, sugerindo homogeneidade genética para as populações de *L. purpureus* da costa brasileira (GOMES et al., 2012).

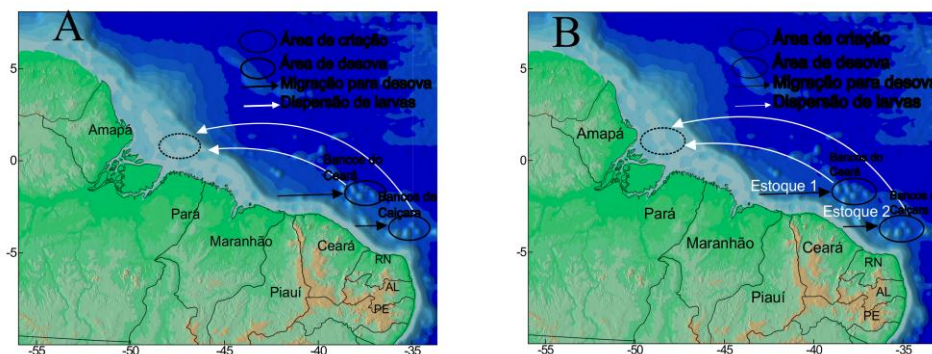


Figura 4. Circuitos migratórios para *Lutjanus purpureus* na costa brasileira (Norte/Nordeste) com finalidade reprodutiva, proposto por Ivo & Hanson (1982). Esquerda-Hipótese 1; Direita-Hipótese 2.

1.4. Marcadores Moleculares e suas Aplicações

Uma definição simples para marcador molecular seria “qualquer caráter determinado geneticamente e capaz de expressar variação entre indivíduos” (CHENUIL, 2006). Variantes de proteínas conhecidas como alozimas foram um dos primeiros marcadores moleculares a serem amplamente utilizados em estudos populacionais e/ou de ecologia molecular (BEEBEE & ROWE, 2008). No entanto, esta categoria de marcador apresenta alguns aspectos que tornam sua aplicação limitada, como o requerimento de tecido fresco (i. e. proteínas degradam rapidamente após a morte do indivíduo) (HEIST, 2004; TOURIYA et al., 2003), além da ocorrência de mudanças que não afetam a mobilidade durante a corrida eletroforética (TOURIYA et al., 2003).

O advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987), na década de 1980, permitiu o surgimento de um vasto número de marcadores moleculares que acessam diretamente o polimorfismo existente nas sequências nucleotídicas, tais como fragmentos obtidos após sequenciamento de DNA (WARD,

2000). Após esse período, segmentos do DNA mitocondrial (mtDNA), foram e continuam sendo uma das ferramentas moleculares mais utilizadas para inferências de passado demográfico e evolutivo de populações e espécies (BALLARD & WHITLOCK, 2004), principalmente devido à facilidade de isolamento, elevado número de cópias por célula e elevada taxa de evolução (GALTIER et al., 2009), além disso, o DNA mitocondrial possui usualmente herança uniparental, apresentando estimativas de tamanho efetivo quatro vezes menores em comparação com regiões autossômicas (SUNNUCKS, 2000; TEMPLETON, 2002).

Por outro lado, a herança uniparental, torna o uso exclusivo de marcadores baseados em DNA mitocondrial insuficiente em casos onde exista hibridização, separação incompleta de linhagens ou introgressão (BERMINGHAM & MORITZ, 1998), por isso atualmente tem se tornado crescente o uso destes marcadores em associação com segmentos nucleares, como os íntrons (AVISE, 2009), uma vez que estes geralmente apresentam elevado polimorfismo, estão em associação com regiões codificantes e supostamente evoluem de forma neutra (TOURIYA et al., 2003).

A automação do sequenciamento de DNA e a consequente disponibilidade de um vasto número de sequências nucleotídicas (NIELSEN, 2001) promoveram o desenvolvimento de métodos de inferências baseados em genealogias que revolucionaram as análises na área da genética de populações (CARSTENS et al., 2012; YANG & RANNALA, 2012).

Com o surgimento de métodos baseados em coalescência, surgiram inúmeros argumentos favoráveis à incorporação de análises de múltiplas regiões genômicas não ligadas (KNOWLES & MADDISON, 2002; MCCORMACK et al., 2013), já que diferentes regiões do genoma podem ser afetadas por distintas forças evolutivas (e. g. deriva gênica, gargalos, recombinação, seleção) e nestes casos afetando de maneira distinta a história de genes e genomas (ZHANG & HEWITT, 2003). Sendo assim, linhagens poderiam ser perdidas e a história evolutiva (de espécies ou populações) poderia não ser fielmente inferida a partir da análise da genealogia de um único marcador (HO & SHAPIRO, 2011; KNOWLES & MADDISON, 2002).

Em tais casos ao se conduzir análises empregando *loci* independentes, seria possível inferir histórias populacionais em um nível mais acurado (GILL et al., 2013; HO & SHAPIRO, 2011). Vários estudos, portanto, vêm empregando tais abordagens, como (EYTAN & HELLBERG, 2010; GAITHER et al., 2010; 2011).

1.4.1. Estudos Genéticos com *L. purpureus*

Mesmo *L. purpureus* sendo uma espécie com elevada importância econômica e ecológica, inclusive com suspeita de sobrepesca (MENDOZA & LAREZ, 2004), poucos estudos com dados moleculares foram conduzidos com a espécie na costa atlântica Ocidental. Das análises disponíveis, todas foram limitadas a utilização de marcadores mitocondriais.

O primeiro trabalho com esta espécie, conduzido por Salles et al.(2006), utilizou um fragmento do gene mitocondrial Citocromo b (Cit b), além de análises morfométricas. Estes autores demonstraram a existência de diferenças morfológicas entre espécimes coletados nos lados Oeste e Leste da desembocadura do Rio Amazonas (costa Norte do Brasil), sendo que os indivíduos do lado oeste apresentariam maiores cabeças, diâmetro dos olhos e apêndices peitorais, em relação aos coletados na porção leste, o que foi interpretado como distintas estratégias de alimentação/ reprodução adotada pela espécie, causada por diferentes condições ambientais impostas pela enorme vazão do Rio Amazonas. A análise de 12 sequências de um fragmento de 307 pb do gene Cit b também foi contundente quanto à existência desses dois estoques na região, já que foram associados distintos haplótipos a cada uma dessas áreas (SALLES et al., 2006) (**Figura 5**).

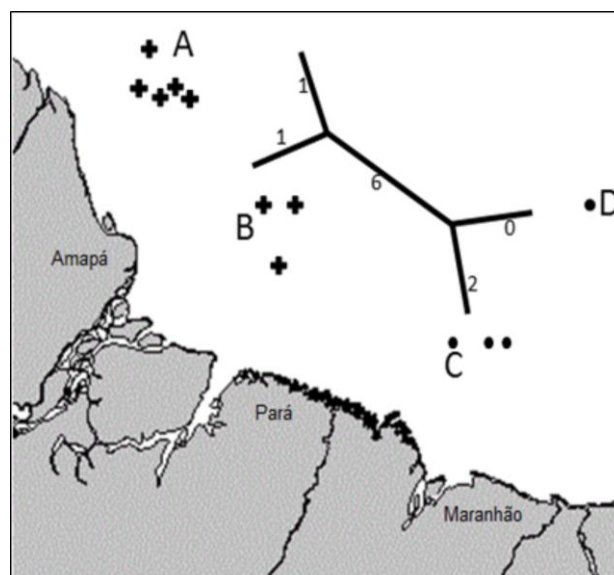


Figura 5. Distribuição e relação genealógica entre os quatro haplótipos encontrados por Salles et al. (2006). Haplótipos A (•), B(•), representam o estoque Oeste. Haplótipos C (■)D(■), representam o estoque Leste. Números mostram as diferenças nucleotídicas entre ramos. Baseada em Salles et al. (2006).

Gomes et al. (2008) analisaram cerca de 400 pb da Região controle mitocondrial (RC), referentes a 93 indivíduos coletados ao longo da costa Norte brasileira (Amapá, Pará e Maranhão). Os resultados mostraram intenso fluxo gênico entre as localidades e elevados níveis de variação genética, sugerindo um único estoque de pargo para esta região.

Devido à intensa similaridade morfológica entre *L. purpureus* e *L. campechanus* (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993) e a disponibilidade de sequências da RC para esta última espécie no banco público *Genbank*, resolveu-se analisar as populações das diferentes espécies em conjunto. Os resultados demonstraram elevados valores de diversidade genética para ambos e ausência de monofília recíproca para *L. purpureus* e *L. campechanus*, sugerindo a existência de uma única espécie de pargo vermelho ao longo do Atlântico Ocidental, além disso, mais de 90 % da variância genética foi atribuída à divergência existente dentro das populações e não entre as espécies (GOMES et al., 2008).

Em uma análise posterior, com ampliação do fragmento da RC para 810 pb e localidades amostradas, com representatividade para toda área de distribuição brasileira da espécie, (GOMES et al., 2012) obtiveram resultados similares. As análises dos 239 espécimes coletados ao longo da distribuição brasileira da espécie em conjunto com sequências de *L. campechanus* disponíveis no *Genbank*, sugeriram que *L. purpureus* e *L. campechanus* representam uma única espécie, porém com certa restrição de fluxo gênico. Relatou-se também a ocorrência de um elevado número de haplótipos únicos, o que sugere evento histórico de expansão demográfica. Além disso, considerando apenas *L. purpureus*, observou-se elevados níveis de fluxo gênico, indicando homogeneidade genética para as populações brasileiras, representando um único estoque para a costa do Brasil (GOMES et al., 2012).

1.5. Justificativa

Porções do DNA mitocondrial vêm sendo os principais marcadores para estudos de grupos de recente divergência (e. g. estudos filogeográficos) (AVISE, 2000; MCCUSKER & BENTZEN, 2010), por serem mais sensíveis em detectar diferenciação genética, assim como oscilações históricas de tamanho efetivo, sendo este quatro vezes menor que o apresentado pela maioria dos segmentos do genoma nuclear (BIRKY et al., 1989; SUNNUCKS, 2000; ZINK & BARROWCLOUGH, 2008), além do possível modo de evolução neutra (MCCUSKER & BENTZEN, 2010).

Por outro lado, a ação da deriva gênica é inversamente relacionada ao tamanho efetivo populacional, portanto, qualquer divergência existente em populações com elevados tamanhos efetivos poderia não ser detectada com o emprego exclusivo de marcadores de evolução neutra (KIRK & FREELAND, 2011; LARMUSEAU et al., 2010), já que estes geralmente detectam diferenciação genética quando o N_e é bastante reduzido ou quando o fluxo gênico é cessado (HOFFMANN & WILLI, 2008).

Espécies marinhas normalmente possuem grandes tamanhos efetivos (DE WOODY & AVISE, 2000; MCCUSKER & BENTZEN, 2010), portanto processos evolutivos nessas populações seriam mais influenciados por seleção, do que por deriva gênica (NIELSEN et al., 2007). Além disso, algumas espécies marinhas, como *L. purpureus* apresentam distribuições de milhares de quilômetros e, portanto poderiam encontrar-se em meio a variantes condições ambientais, o que poderia resultar em adaptações fisiológicas a estes locais. Logo, nestes casos, seria interessante uma análise de marcadores neutros em conjunto com segmentos constituintes de regiões genômicas envolvidas na codificação de produtos relacionados a ajustes fisiológicos, como os íntrons destas regiões (BUTLIN, 2010), já que o fato destes serem adjacentes a regiões sob seleção poderia demonstrar diferenciação genética correspondente à adaptação local (ANDRÉ et al., 2011; CONOVER et al., 2006).

Uma análise desta natureza com *L. purpureus* forneceria o embasamento necessário para um melhor entendimento sobre processos que moldam a história evolutiva desta espécie (BOS et al., 2008). Múltiplos *loci* forneceria ainda um cenário mais verossímil sobre a história demográfica do pargo ao longo da costa brasileira. Uma vez que esta espécie é um importante recurso pesqueiro nessa região (MILOSLAVICH et al., 2011), estas informações são essenciais para uma delimitação mais acurada dos estoques

(PORTNOY & HEIST, 2012; SELKOE & TOONEN, 2006), sendo primordiais para a criação e efetivação de planos de manejo (SHAW et al., 2004).

A inclusão de *loci* nucleares, além daqueles mitocondriais (Região Controle, Citocromo b e NADH – Desidrogenase, subunidade 4 – ND4), certamente fornecerá um cenário mais robusto e acurado sobre a estrutura genética desta espécie e claro, de aspectos relacionados à sua história evolutiva. Portanto, para o presente trabalho, serão desenvolvidos iniciadores específicos para amplificação de regiões intragênicas em *L. purpureus* e testada à aplicabilidade para abordagens populacionais, o que corresponderá a um capítulo da Dissertação. No capítulo seguinte, serão reunidos os *loci* nucleares, com polimorfismo previamente avaliado, além dos mitocondriais para uma análise refinada da estrutura genética de *L. purpureus* na costa do Atlântico Ocidental.

1.6. Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver marcadores a partir de regiões intragênicas e avaliar a estrutura populacional e filogeografia de *Lutjanus purpureus* do Atlântico Ocidental, utilizando uma abordagem *multilocus*;

1.6.1. Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver iniciadores para regiões intragênicas e testar sua aplicabilidade para abordagens populacionais em *L. purpureus*;
- ✓ Avaliar os níveis de diversidade genética das populações;
- ✓ Verificar a história demográfica da espécie e os possíveis processos evolutivos envolvidos;
- ✓ Realizar inferências sobre os níveis de fluxo gênico da espécie ao longo da região estudada;
- ✓ Investigar a relação de aspectos bioecológicos da espécie com informações da estrutura genética populacional;

1.7. Referências Bibliográficas

ALLEN, G.-R. **Snappers of the World. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date.** Vol 6 ed. Rome: FAO. v. 6, 208 p, 1985.

ANDERSON, W. D. **Field Guide to the Snappers (Lutjanidae) of the Western Atlantic.** 1967.

ANDERSON, W. D. Lutjanidae. In: CARPENTER, K. E. (Ed.). . **The living marine resources of the Western Central Atlantic, Vol. 3: Bony Fishes, Part 2 (Opistognathidae to Molidae).** FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists, p. 1479–1505, 2003.

ANDRÉ, C. et al. Detecting population structure in a high gene-flow species , Atlantic herring (*Clupea harengus*): direct , simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. **Heredity**, v. 106, p. 270–280, 2011.

AVISE, J. C. **Phylogeography The History and Formation of species.** Cambridge, MA: Havard University Press. 447 p, 2000.

AVISE, J. C. Phylogeography: Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3–15, 2009.

BALLARD, W. J.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729–744, 2004.

BEEBEE, T.; ROWE, G. **An Introduction to Molecular Ecology.** Second Edi ed. New York: Oxford University Press, p. 400, 2008.

BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 367–369, 1998.

BETANCUR-R, R. et al. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **Plos Currents**, p. 45, 2013.

BIRKY, C. W.; FUERST, P.; MARUYAMA, T. Organelle Gene Diversity under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to Nuclear Genes. **Genetics**, v. 121, n. 3, p. 613–627, 1989.

BOS, D. H. et al. Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. **Evolution**, v. 62, n. 6, p. 1458–1568, 2008.

BUTLIN, R. K. Population genomics and speciation. **Genetica**, v. 138, p. 409–418, 2010.

CARSTENS, B.; LEMMON, A. R.; LEMMON, E. M. The promises and pitfalls of next-generation sequencing data in phylogeography. **Systematic Biology**, v. 61, n. 5, p. 713–5, 2012.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela**. 2. ed. Caracas, Venezuela: Fundacion Científica Los Roques, v. II, p. 498, 1993.

CERVIGÓN, F. et al. **FAO species identification sheets for fishery purpose. Field Guide to the Commercial marine and Brackish-water Resources of the Northern Coast of South America**. Rome: FAO, p. 513, 1993.

CHENUIL, A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 101–120, 2006.

CONOVER, D. O. et al. Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 21–47, 2006.

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

EYTAN, R. I.; HELLBERG, M. E. Nuclear and mitochondrial sequence data reveal and conceal different demographic histories and population genetic processes in Caribbean reef fishes. **Evolution**, v. 64, n. 12, p. 3380–3397, 2010.

FONTELES-FILHO, A. A. **Síntese sobre a distribuição, Abundância, Potencial Pesqueiro, e Biologia do pargo, *Lutjanus purpureus*, Poey da Zona Econômica Exclusiva do Nordeste do Brasil**. Brasília: p 25, 2000.

FONTELES-FILHO, A. A. Estudo sobre a Biologia da pesca do Pargo *Lutjanus purpureus* Poey, no Nordeste Brasileiro - dados de 1969. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 10, n. 1, p. 73–78, 1970.

FROESE, R.; PAULY, D. E. **FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (02/2014)**. Acesso 23 Março de 2014.

FURTADO-OGAWA, E.; MENEZES, M. M. Alimentação do Pargo *Lutjanus purpureus* Poey, no Nordeste brasileiro. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 12, n. 2, p. 105–108, 1972.

GAITHER, M. R. et al. Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 133–147, 2010.

GAITHER, M. R. et al. Phylogeography of the reef fish *Cephalopholis argus* (Epinephelidae) indicates Pleistocene isolation across the Indo-Pacific Barrier with contemporary overlap in The Coral Triangle. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 189, 2011.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 22, p. 4541–50, 2009.

GESTEIRA, T. C. V.; IVO, C. T. C. Estudo da reprodução e fecundidade do pargo *Lutjanus purpureus* Poey, do Norte e Nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 13, n. 2, p. 109–112, 1973.

GILL, M. S. et al. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 3, p. 713–724, 2013.

GOMES, G. et al. Can *Lutjanus purpureus* (South red snapper) be “legally” considered a red snapper (*Lutjanus campechanus*)? **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 372–376, 2008.

GOMES, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Population structure of *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae - Perciformes) on the Brazilian coast: further existence evidence of a single species of red snapper in the western Atlantic. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 979–999, 2012.

GONZÁLEZ, L. W. .; ESLAVA, N.; SILVA, C. Edad, Crecimiento y mortalidad de *Lutjanus purpureus* Poey, 1867 (Pisces: Lutjanidae) de la region de Guayanas. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras**, v. 27, p. 7–20, 1998.

GONZÁLEZ, L. W.; ESLAVA, N. Edad, Crecimiento del pargo colorado *Lutjanus purpureus* Poey, 1867 (Teleostei: Lutjanidae) de la región Oriental de Venezuela. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 34, n. 1, p. 99–107, 1999.

HEIST, E. J. Genetics: stock identification. In: Musick, J.A. Bonfil, R. **Elasmobranch Fisheries Management Techniques**. Singapore: Asia-Pacific Economic Cooperation, p. 79–96,. 2004.

HO, S. Y. W.; SHAPIRO, B. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 423–434, 2011.

HOFFMANN, A. A.; WILLI, Y. Detecting genetic responses to environmental change. **Nature reviews Genetics**, v. 9, n. June, p. 421–432, 2008.

IVO, C. T. C.; HANSON, A. J. Aspectos da Biologia e dinâmica Populacional do Pargo *Lutjanus purpureus* Poey, no Norte e Nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 22, n. 1/2, p. 1–41, 1982.

JOHANES, R. E. Reproductive strategies of coastal marine fishes in the tropics. **Env. Biol. Fish.**, v. 3, n. 1, p. 65–84, 1978.

JOHNSON, G. D. The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families. **Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography**, v. 24, p. 1–114, 1980.

- KIRK, H.; FREELAND, J. R. Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 6, p. 3966–3688, 2011.
- KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2623–2635, 2002.
- LARMUSEAU, M. H. D. et al. Mito-nuclear discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. **Heredity**, v. 105, n. 6, p. 532–542, 2010.
- MCCORMACK, J. E. et al. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 526–538, 2013.
- MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 22, p. 4852–4862, 2010.
- MENDOZA, J. J.; LAREZ, A. A biomass dynamics assessment of the southeastern Caribbean snapper–grouper fishery. **Fisheries Research**, v. 66, n. 2, p. 129–144, 2004.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil.IV.Teleostei (3)**. São Paulo: Museu de Zoologia-Universidade de São Paulo. p. 96, 1980.
- MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Phylogenetic relationships of some common Indo-Pacific snappers (Perciformes: Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences, with comments on the taxonomic position of the Caesioninae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 450–460, 2007.
- MILOSLAVICH, P. et al. Marine biodiversity in the Atlantic and Pacific coasts of South America: knowledge and gaps. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. e14631, 2011.
- MOURA, R. L.; LINDEMAN, K. C. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*. **Zootaxa**, v. 43, p. 31–43, 2007.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 55, n. 335-350, 1987.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 601, 2006.
- NIELSEN, E. E. et al. Historical analysis of Pan I in Atlantic cod (*Gadus morhua*): temporal stability of allele frequencies in the southeastern part of the species distribution. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, p. 1448–1455, 2007.
- NIELSEN, R. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. **Heredity**, v. 86, n. Pt 6, p. 641–647, 2001.

PORTNOY, D. S.; HEIST, E. J. Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 1120–1140, 2012.

RIVAS, L. R. Review of the *Lutjanus campechanus* complex of red snappers. **Quart J Fla Acad Sci**, v. 29, n. 2, p. 117–136, 1966.

SALLES, R. et al. Morphometric and Mitochondrial DNA analyses of the caribbean red snapper, *Lutjanus purpureus* (Teleostei, Lutjanidae), in Western Atlantic off Northern Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 2, p. 115–125, 2006.

SELKOE, K. A; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SHAW, P. W.; ARKHIPKIN, A. I.; AL-KHARIRULLA, H. Genetic structuring of Patagonian toothfish populations in the Southwest Atlantic Ocean: the effect of the Antarctic Polar Front and deep-water troughs as barriers to genetic exchange. **Molecular ecology**, v. 13, p. 3293–3303, 2004.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.

TEMPLETON, A. Out of Africa again and again. **Nature**, v. 416, n. 6876, p. 45–51, 2002.

TOURIYA, A. et al. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. **BioTechniques**, v. 35, n. 4, p. 676–682, 2003.

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

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 563–584, 2003.

ZINK, R. M.; BARROWCLOUGH, G. F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 9, p. 2107–2121, 2008.

Capítulo II

Desenvolvimento de Marcadores Intragênicos e Aplicabilidade em análises populacionais em Lutjanídeos (Perciformes)

Desenvolvimento de Marcadores Intragênicos e Aplicabilidade em Análises Populacionais em Lutjanídeos (Perciformes)

Raimundo da Silva¹, Danillo Silva¹, Ivana Veneza¹, Iracilda Sampaio², Horacio Schneider² & Grazielle Gomes¹.

¹ Laboratório de Genética Aplicada, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

² Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

Alameda Leandro Ribeiro, S/N, Aldeia, Bragança-Pará- Brasil

Autor para correspondência:

Grazielle Gomes

091 3425 1593

e-mail: graziellefeg@gmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico *Conservation Genetics Resources*.

RESUMO

No presente estudo foram desenvolvidos oito iniciadores baseados em íntrons para a amplificação em lutjanídeos e outros Teleósteos marinhos. Baseado em *Lutjanus purpureus*, a maioria das regiões genômicas aqui utilizadas apresentou índices de diversidade genética iguais ou superiores a regiões intragênicas comumente empregadas nas análises de estudos populacionais. Além disso, para boa parte dos iniciadores aqui utilizados foi possível obter amplificação cruzada para outros níveis taxonômicos (i. e. Famílias, Ordens). Assim, os novos iniciadores aqui descritos podem ser utilizados para a elucidação de questões intraespecíficas em um vasto número de táxons.

Palavras-chave: Íntron, EPIC, *Lutjanus*, pargo

INTRODUÇÃO

Os avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA facilitaram o acesso à informação contida em elevado número de *loci*, o que por sua vez promoveu grandes avanços no campo da genética de populações e áreas afins. Atualmente, mesmo com a emergência de análises com uma grande quantidade de *loci* (i.e, transição da genética de populações, para a genômica de populações), ainda faz-se necessário abordagens iniciais empregando umas poucas regiões genômicas independentes, para a descrição de processos evolutivos atuantes em um dado grupo taxonômico (BOWEN et al., 2014).

Uma classe de marcadores que vem sendo bastante utilizada em nível populacional está representada por sequências de DNA nuclear (e. g., íntrons). Íntrons são regiões intragênicas não traduzidas do genoma nuclear, e que em alguns casos, apresentam um nível de polimorfismo capaz de revelar informações a respeito da estrutura populacional de táxons, sendo por isso, adequados para o uso em genética de populações e filogeografia, além de evoluírem de maneira neutra (ZHANG & HEWITT, 2003). Além do mais, vem sendo postulado que, marcadores baseados em sequência de DNA são adequados para a elucidação de processos de demografia histórica (BRUMFIELD et al., 2003).

Nesse contexto, íntrons vêm sendo bastante utilizados para elucidar diversos aspectos inerentes à dinâmica populacional histórica em diversos táxons marinhos, inclusive lutjanídeos (GAITHER et al., 2010; 2011)

A proposta do presente estudo foi o desenvolvimento de iniciadores, por meio da técnica de EPIC-PCR para a amplificação em peixes da família Lutjanidae, (com base em *Lutjanus purpureus*), além da tentativa de amplificação cruzada para outros Teleósteos, já que EPICs possuem a vantagem de serem aplicáveis em um vasto nível taxonômico (ZHANG & HEWITT, 2003). Lutjanídeos e vários outros grupos de teleósteos marinhos são organismos que possuem ampla distribuição geográfica, o que os tornam interessantes para investigações filogeográficas e genético-populacionais. Em relação à Lutjanidae, existe considerável número de estudos de caracterização e desenvolvimento de marcadores de microssatélites (PINSKY & PALUMBI, 2014), porém são escassas as análises populacionais com o emprego de íntrons (i.e., GAITHER et al., 2010). Lutjanídeos são importantes recursos pesqueiros, assim informações genéticas são fundamentais para a delimitação e manejo de estoques pesqueiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Para amplificação das regiões intragênicas foram desenvolvidos iniciadores através da técnica de EPIC- PCR (*Exon Primer Intron Crossing*), com base em sequências disponíveis no Genbank (**Tabela 1**), cujos íntrons apresentavam-se com um fragmento entre 200 – 1000 pb. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do software FastPCR (KALENDAR et al., 2009).

Para a caracterização dos níveis de polimorfismo, os iniciadores aqui desenvolvidos (Tabela 1) foram inicialmente utilizados em exemplares da espécie *Lutjanus purpureus*, coletados na costa do estado do Pará (Norte do Brasil). Posteriormente foi testada a amplificação cruzada para vários outros Teleósteos: outro lutjanídeo (*Lutjanus synagris*), um cianídeo (*Cynoscion jamaicensis*), e um anablepídeo (*Anableps anableps*).

O material genômico foi isolado empregando-se o protocolo de extração com fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Os segmentos de interesse foram amplificados via PCR, usando-se os iniciadores descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 15 µL, contendo 200 mM de cada um dos DNTPS, tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 5mM de cada iniciador, aproximadamente 50 ng de DNA molde, 1U de Taq Polimerase, e água para completar o volume final da reação. As condições de amplificação foram: 95 °C- 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C- 35 segundos (desnaturação), 45 segundos (hibridização), 80 segundos a 72 °C (extensão), e um ciclo final de 3 minutos a 72 °C (extensão final). As PCRs positivas foram sequenciadas pelo método dideoxiterminal (SANGER et al., 1977), no sequenciador automático ABI 3500 XL.

As sequências foram editadas e alinhadas manualmente no programa BIOEDIT (HALL, 1999). Eventos de heterozigose por indel foram solucionados no Mixed Sequences Reader (CHANG et al., 2012). A fase gamética foi resolvida pelo algoritmo PHASE v. 2. 1. (STEPHENS et al., 2001), implementado no DNAsp v. 5.10. (LIBRADO & ROZAS, 2009), com base em 1000 repetições principais, 1000 repetições de *burn-in*, e empregando-se um limiar de 0,6. Em alguns casos, haplótipos que retornaram com probabilidades inferiores a 0,6 foram resolvidos pelo método de Clark (1990).

Para avaliação dos níveis de polimorfismo dos marcadores, foram estimados os números de sítios polimórficos, índices de diversidade genética, haplotípica (h) e nucleotídica (π), no programa DNAsp (LIBRADO & ROZAS, 2009).

A presença de recombinação intragênica foi estimada por meio de teste Phi (BRUEN et al., 2006), disponível no SplitsTree (HUSON & BRYANT, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram desenvolvidos, amplificados e sequenciados oito íntrons, com tamanhos que variaram entre 180 e 600 pb (**Tabela 2**). Todos os marcadores, com exceção ao Int2, apresentaram algum nível de polimorfismo (**Tabela 2**).

Para os marcadores polimórficos, o número de sítios segregantes variou entre dois (LWSCO 1) e 12 (FC 1). Os valores de diversidade genética variaram de 0.090 ± 0.090 (LWSCO 1) a $0,94 \pm 0.018$ (Delta 10) para h , e entre 0,053% (LWSCO 1) a 1,053% (Tripsina) para os valores de π .

Grande parte dos marcadores foi amplificada com sucesso em outras espécies, incluindo membros de outras Famílias e até mesmo de outras Ordens de peixes. Assim, os marcadores padronizados no presente estudo mostram-se como uma alternativa para o desenvolvimento de estudos genético-populacionais e filogeográficos em um vasto nível taxonômico.

Deve-se ainda ressaltar que todos estes marcadores apresentaram níveis de variação genética similares ou superiores a algumas regiões intragênicas previamente utilizadas em outros Teleósteos marinhos, incluindo lutjanídeos (e. g. GAITHER et al., 2010) e também aqui testadas para nível de comparação (dados não apresentados). Em alguns casos os valores de variação genética são equiparáveis ao apresentado por regiões mitocondriais. Por exemplo, para o Delta 10 foi observado um valor de diversidade genética (h) de 0,94 e, portanto bastante semelhante ao comumente apresentado por porções hipervariáveis do DNA mitocondrial (e. g. região controladora). Mesmo para os demais casos, (com exceção do Int 2, LWSCO 1) os níveis de variação genética observados (i. e. $h \leq 0,75$; Tabela 2), foram compatíveis ou superiores com o polimorfismo apresentado por segmentos do genoma mitocondrial comumente utilizados em estudo a nível intraespecífico, e. g. Citocromo B, ND4, (KARLSSON et al., 2009).

Além disso, boa parte das regiões intrônicas aqui analisadas, são adjacentes a segmentos genômicos envolvidos em funções de ajustes fisiológicos (e.g Mio 1, Mio 2, IGF 1). Espécies marinhas que possuem ampla distribuição geográfica podem permanecer sujeitas a distintos regimes ambientais (ANDRÉ et al., 2011). Assim em espécies sujeitas processos de adaptação local, e a análise de regiões envolvidas em ajustes fisiológicos, podem fornecer informações acuradas acerca de processos não-neutros que moldam a história evolutiva de tais táxons (BOS et al., 2008). Dessa forma, os marcadores descritos no presente estudo podem fornecer informações robustas para a compreensão de processos evolutivos atuantes em populações de peixes marinhos, assim como para a identificação e delimitação acurada de estoques pesqueiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ, C. et al. Detecting population structure in a high gene-flow species, Atlantic herring (*Clupea harengus*): direct, simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. **Heredity**, v. 106, p. 270–280, 2011.
- BOS, D. H. et al. Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. **Evolution**, v. 62, n. 6, p. 1458–1568, 2008.
- BOWEN, B. W. et al. Phylogeography unplugged: comparative surveys in the genomic era. **Bulletin of Marine Science**, v. 90, n. 1, p. 13–46, 2014.
- BRUEN, T. C.; PHILIPPE, H.; BRYANT, D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2665–2681, 2006.
- BRUMFIELD, R. T. et al. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 249–256, 2003.
- CHANG, C.-T. et al. Mixed sequence reader: a program for analyzing DNA sequences with heterozygous base calling. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- CLARK, A. G. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 111–122, 1990.
- GAITHER, M. R. et al. Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 133–147, 2010.
- GAITHER, M. R. et al. Phylogeography of the reef fish *Cephalopholis argus* (Epinephelidae) indicates Pleistocene isolation across the Indo-Pacific Barrier with contemporary overlap in The Coral Triangle. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 189, 2011.
- HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2006.
- KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. **Focus on Bioinformatics**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2009.
- KARLSSON, S.; SAILLANT, E.; GOLD, J. R. Population structure and genetic variation of lane snapper (*Lutjanus synagris*) in the northern Gulf of Mexico. **Marine Biology**, v. 156, n. 9, p. 1841–1855, 2009.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

PINSKY, M. L.; PALUMBI, S. R. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 29–39, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, 2001.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 563–584, 2003.

Tabela 1. Descrição para os marcadores utilizados no presente estudo.

Locus	Iniciadores	Sequência 5'-3'	Hibridização (°C)	Sequência base (código de acesso)
Delta 6 desaturase- Íntron9	Delt6 F9	TTACTACCTTCGCTACCTGTGCT	64	<i>Sparusaurata</i> (AF525692)
	Delt6 R9	AGTCACCCACACAAACCAGTKAC		
Delta 6 desaturase- Íntron10	Delt6 F10	G TTCAGCGGACACCTCAACT	50	<i>Sparusaurata</i> (AF525692)
	Delt6 F10	CACACAGTGCGTGGACAAG		
Miostatina- Íntron1	Mio 1F	ATGAGCATGCCATCACAGAG	64	<i>Latescalcarifer</i> (EF672685)
	Mio 1R	ATGCGATTGGCTTGAACTT		<i>Lutjanus russellii</i> (JQ068866)
Miostatina- Íntron2	Mio 2F	GCATCGAGATTAACGCCTTC	64	<i>Latescalcarifer</i> (EF672685)
	Mio 2R	GGCCCTCTGAGATCTTCACC		<i>Lutjanus russellii</i> (JQ068866)
Tripsina - Íntron1	Try 2F	CCTGATCTCCAGCACCTGGGTK	60	<i>Lutjanus fulvus</i> (AB738891)
	Try 2R	GATGTCATTGTYCAGGTTGCSGCT		
LWSCO - Íntron1	LWSCO 1F	GCTGATCTGGGAGAGACAGTTT	60	<i>Lutjanus johnii</i> (FJ824756)
	LWSCO 1R	CATTTGGCATCAAACCTTGACAT		
Insulin like Growth Factor (IGF1)	FC-F1	AGCGCTCTTTCCTTTCAGTG	59	<i>Dicentrarchus labrax</i> (GQ924783)
	FC-R1	CRCACAGCAGTAGTGAGAGG		
Interferon- Íntron2	Int 2F	GTACAGMCAGGCGTCCAAAGCAT	64	<i>Dicentrarchus labrax</i> (AM946400)
	Int 2R	GTTCTCCTCCCATGATGCMGAG		<i>Sparus aurata</i> (FM882244)

Tabela 2. Estatísticas para os marcadores analisados no presente estudo.

Íntron	N	Tamanho (pb)	Nh	S	h \pm dp	π (em%) \pm dp	Indel	Amplificação cruzada
Delta6-9	20	571	11	11	0,871 \pm 0.028	0,557 \pm 0,039	1	a,b
Delta6- 10	20	535	18	13	0,94 \pm 0.018	0,7 \pm 0,058	3	b,c
Miostatina-1	22	363	13	10	0,857 \pm 0.033	0,876 \pm 0,049	3	a,b,c
Miostatina-2	22	637	10	8	0,782 \pm 0.042	0,272 \pm 0,028	1	a,b,c
Tripsina-1	22	259	9	7	0,755 \pm 0.049	1,053 \pm 0,046	2	a,c
LWSCO-1	22	172	3	2	0,090 \pm 0.090	0,053 \pm 0,035	0	a,c
FC1-1	20	468	14	12	0,849 \pm 0.039	0,465 \pm 0,050	2	b
Interferon-2	22	530	1	0	0	0	0	c

N- Tamanho amostral; Nh- Número de haplótipos; S- Sítios polimórficos; h= Diversidade haplotípica; π - Diversidade nucleotídica; dp = Desvio padrão; Amplificação cruzada: a- *Lutjanus synagris* (Perciformes - Lutjanidae); b- *Cynoscion jamaicensis* (Perciformes – Sciaenidae); c- *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes – Anablepidae)

Capítulo III

Homogeneidade Genética do pargo *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae – Perciformes) do Atlântico Sul Ocidental a partir de análises multilocus

Homogeneidade Genética do pargo *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae – Perciformes) do Atlântico Sul Ocidental a partir de análises multilocus

Raimundo da Silva¹, Iracilda Sampaio², Horacio Schneider² & Grazielle Gomes¹.

¹ Laboratório de Genética Aplicada, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

² Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

Alameda Leandro Ribeiro, S/N, Aldeia, Bragança-Pará- Brasil

Autor para correspondência:

Grazielle Gomes

091 3425 1593

e-mail: graziellefeg@gmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico *BMC Evolutionary Biology*

RESUMO

Lutjanus purpureus é uma espécie marinha comumente associada a fundos rochosos, possuindo uma ampla distribuição geográfica, e, portanto, um bom modelo para a investigação de processos microevolutivos no ambiente marinho. *L. purpureus* ainda possui elevada importância comercial ao longo de sua área de ocorrência. Sabe-se que para espécies que são exploradas pela pesca comercial, informações sobre delimitação, e reconhecimento de estoques, são fundamentais para a criação e o estabelecimento de medidas conservacionistas. Apesar disso, poucas são as investigações relacionadas à arquitetura genética da espécie, sendo que os estudos existentes foram baseados somente a uma porção do DNA mitocondrial. O presente estudo empregou uma abordagem multilocus (12 segmentos de DNA mitocondrial e Nuclear) para a elucidação de questões relacionadas a níveis de diversidade genética, conectividade genética de populações, e demografia histórica. *L. purpureus* apresentou elevados índices de diversidade genética, o que certamente implica em elevados N_e para a espécie. Os dados demonstraram que esta espécie apresenta homogeneidade genética ao longo da região geográfica analisada, provavelmente mediada por dispersão nos estágios iniciais de desenvolvimento. Em relação à demografia histórica, é demonstrada a existência de um evento histórico de crescimento populacional, certamente relacionado a oscilações no nível do mar ocorridas durante o Pleistoceno.

Palavras-chave: pargo, *Lutjanus purpureus*, íntrons, mtDNA.

INTRODUÇÃO

Devido à aparente ausência de barreiras vicariantes no ambiente marinho, processos que conduzem ao isolamento genético são pouco frequentes em comparação a ambientes continentais (PALUMBI, 1994). Em adição, características inerentes a cada espécie (e. g., duração de estágio pelágico larval (PLD), tipo de ovo, local de desova) vêm sendo mencionadas como fatores que promovem a ocorrência de elevados níveis conectividade genética entre populações marinhas (SELKOE et al., 2014), mesmo para aquelas que são separadas por grandes distâncias geográficas.

Apesar disso, várias espécies marinhas que apresentam vastas distribuições espaciais podem encontrar-se em meio a condições ambientais distintas, o que possivelmente pode conduzir a processos de adaptação local (e.g. NIELSEN et al., 2009; WANG et al., 2013). Desse modo, tais táxons tornam-se interessantes para a investigação de processos evolutivos no ambiente marinho.

O pargo *Lutjanus purpureus* (Poey 1866) é um lutjanídeo comumente associado a fundos arenosos e rochosos, possuindo ampla distribuição ao longo da costa do Atlântico Ocidental, desde Cuba até o Sudeste do Brasil (MOURA & LINDEMAN, 2007). A espécie apresenta fecundação externa, sendo que a desova ocorre em meio à plataforma continental. As larvas possuem ainda uma fase de desenvolvimento pelágico (FONTELES-FILHO, 2000), cuja duração é desconhecida, mas possivelmente estende-se por cerca de 30 dias, conforme ao já relatado para a maioria dos lutjanídeos da mesma área de distribuição (LINDEMAN et al., 2001). Todas as características acima levantadas podem, portanto, promover uma maior dispersão dos indivíduos.

O pargo possui um histórico de mais de meio século de intensa exploração pesqueira na costa do Brasil, no entanto, poucos são os estudos genéticos ao nível intraespecífico envolvendo *L. purpureus*. Os únicos referem-se a Gomes et al. (2008; 2012), que a partir de segmentos da Região Controle mitocondrial relataram a existência elevados índices de diversidade genética para a espécie. Estes estudos demonstraram ainda a ocorrência de um evento histórico de expansão populacional, possivelmente decorrente de oscilações no nível do mar durante o Pleistoceno, além de elevados níveis conectividade genética para a espécie na costa brasileira, provavelmente mantida pela grande capacidade de dispersão larval de *L. purpureus* em conjunto com a atuação de correntes oceânicas.

O reconhecimento de processos atuantes em unidades independentes demograficamente são de fundamental importância para a compreensão dos efeitos da

exploração excessiva sobre estoques pesqueiros (OVENDEN et al., 2013). Desta forma, para espécies que são alvos da pesca comercial, como *L. purpureus*, a delimitação acurada de estoques é imprescindível para a implantação e sucesso de ações conservacionistas (OVENDEN et al., 2013).

Vale ressaltar que os poucos estudos genéticos referentes à *L. purpureus* (e. g. GOMES et al., 2008; 2012), foram conduzidos somente com sequências da Região Controladora do DNA mitocondrial. Sabe-se que análise de processos evolutivos com base em informações contidas em apenas um *locus* pode não refletir a verdadeira história daquela linhagem, devido à natureza estocástica do processo coalescente (NIELSEN & BEAUMONT, 2009). Assim, uma análise envolvendo um conjunto de múltiplos *loci* independentes forneceria informações acerca de processos demográficos históricos com um nível maior de acurácia (e. g. HELED & DRUMMOND, 2008).

Portanto, a proposta do presente estudo foi analisar a estrutura genética de populações, assim como descrever processos demográficos históricos em *L. purpureus* ao longo da costa brasileira, utilizando uma abordagem *multilocus* (12 regiões genômicas - DNA mitocondrial e nuclear).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de material biológico (tecido muscular ou nadadeira) foram coletadas entre os anos de 2003-2010, em quatro pontos específicos da costa Atlântica Ocidental (**Figura 1**). Os exemplares de *L. purpureus* foram identificados com o auxílio de literatura específica (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993). O material coletado foi armazenado em tubos do tipo *ependorff* com álcool 96% e congelado até o momento dos procedimentos laboratoriais.

Procedimentos Laboratoriais

A extração do DNA foi conduzida através do protocolo descrito em Sambrook et al. (1989), com adaptações para tubos de 1,5 mL, ou por meio de isolamento com um kit de extração comercial (*Wizard Genomics* - PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante. O produto da extração foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose, corado

com Gel RedTM (BIOTIUM) e posteriormente visualizado sob luz ultravioleta para a detecção do material isolado.

As regiões genômicas de interesse foram obtidas por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os iniciadores descritos na Tabela 1. As PCRs foram delineadas para um volume final de 15 μ L, consistindo de uma mistura com os quatro deoxinucleotídeos (dNTPs) (200 μ M), tampão (1X), $MgCl_2$ (2 mM), 0,4 μ L de cada iniciador (10 μ M), 0,06 U/ μ L de Taq DNA polimerase, aproximadamente 50 ng de DNA molde, e água ultrapura para completar o volume da reação. Ensaio sem DNA molde foram feitos para checar contaminação. As condições de amplificação estão listadas na Tabela 1.

As amostras foram sequenciadas por meio do método dideoxiterminal (SANGER et al., 1977), no sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems), utilizando-se reagentes do kit Big Dye (*ABI Prism TM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, USA*), seguindo as recomendações do fabricante. Para as regiões nucleares, cada indivíduo foi sequenciado nos dois sentidos, para minimizar ambiguidades na identificação dos sítios.

Bancos de dados

Após o sequenciamento das regiões genômicas, os cromatogramas foram inspecionados visualmente no programa BioEdit v. 7.2.5 (HALL, 1999), onde ainda foi realizado o alinhamento automático das sequências usando-se o aplicativo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997). Para os marcadores nucleares, eventos de heterozigose por inserção ou deleção, foram solucionados através do Mixed Sequences Reader (disponível em: <http://MSR.cs.nthu.edu.tw/>) (CHANG et al., 2012).

A fase gamética dos indivíduos foi determinada por meio do algoritmo Phase v. 2.1 (STEPHENS & DONNELLY, 2003). Foram conduzidas cinco corridas utilizando diferentes sementes randômicas, sendo que cada cadeia constou de 1000 *iterations*, *thinning interval* 1, *burn-in* 1000. Para as análises seguintes, somente foram aceitos haplótipos que retornaram com probabilidades superiores a 0,6. Parte dos haplótipos que possuíam probabilidades inferiores a 0,6 foi resolvida pelo método de Clark (1990). Os arquivos de entrada e saída foram gerados no SeqPhase (disponível em: <http://www.mnhn.fr/jfflot/seqphase>) (FLOT, 2010).

A ocorrência de eventos de recombinação intragênica foi estimada por meio do teste PhiW (BRUEN et al., 2006) disponível no Splits Tree v. 4.6 (HUSON & BRYANT, 2006).

Diversidade e Estrutura genética populacional

A identificação e frequência dos haplótipos nas populações, número de sítios polimórficos, índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) (NEI, 1987) foram estimados no Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Os níveis de fluxo gênico foram inicialmente estimados por meio do F_{ST} par-a-par (WEIR & COCKERHAM, 1984) e a partir da AMOVA (Análise de Variância Molecular) (EXCOFFIER et al., 1992), sendo estas análises conduzidas no Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010), com base em 10.000 permutações. Para análises envolvendo comparações par-a-par, o valor de α foi mantido ao nível crítico de 0,05 por meio da correção de *False Discovery Rate*, conforme o sugerido por Benjamini & Yekutieli (2001).

Uma análise de atribuição *bayesiana* foi conduzida no Structure v. 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) para estimar o número ideal de populações existentes. Nesta abordagem foram usados somente os dados nucleares. Foram testados valores de K entre 1 e 6, e para cada valor de K, foram rodadas 10 cadeias, sendo que cada cadeia

constou de 10^6 passos principais, com 10% desse valor descartado como *burn-in*. O número de K foi inferido pela comparação entre valores médios de probabilidade dos dados e variância existente para cada K. Estes índices foram obtidos no Structure Harvester (disponível em: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>) (EARL & VONHOLDT, 2011).

Análises de agrupamentos também foram conduzidas no Structurama v. 2.0 (HUELSENBECK et al., 2011), sendo que neste caso os dados mitocondriais e nucleares foram agrupados. As corridas constaram de 2×10^6 repetições, e 10 % de *burn-in*, a procura do valor de K foi feita com base na seguinte distribuição: $K = \exp k$ (2).

Para a visualização da relação espacial e genealógica entre os haplótipos foram construídas redes de haplótipos no programa Haploviewer (SALZBURGER et al., 2011), com base em topologias estimadas a partir do método de Máxima Verossimilhança, sendo estas análises conduzidas no PhyML v. 20140911 (GUINDON et al., 2010), com base no modelo evolutivo estimado no PAUP* v. 4.0 a136 (SWOFFORD, 2002).

Neutralidade e Demografia histórica

O ajuste dos dados ao modelo de neutralidade foi verificado por meio das estatísticas F_s (FU, 1997) e D (TAJIMA, 1989). Estes testes foram desenvolvidos para detectar desvios causados por pressões seletivas. No entanto, estas estatísticas são afetadas por eventos históricos de oscilações demográficas, sendo também amplamente utilizadas para a detecção destes processos, especialmente os valores de F_s (FU, 1997; RAMÍREZ-SORIANO et al., 2008). O valor de p para cada um desses índices foi estimado com base em 10.000 permutações, sendo estas análises conduzidas no Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

A dinâmica do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo foi estimada por meio de um método não paramétrico, a análise de *Bayesian Skygrid* (GILL et al., 2013), disponível no pacote BEAST v. 1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012), utilizando um relógio estrito, empregando a taxa de 0,05 sítios/ milhão de anos/ dentro de linhagens, pra a Região Controle, conforme Zhang et al. (2006b). A escolha do modelo evolutivo foi feita com base no modelo sugerido pelo PAUP* 4.0 a136 (SWOFFORD, 2002), utilizando o BIC (SCHWARZ, 1978). As estimativas de *Bayesian Skygrid* acomodam múltiplos *loci*, por isso a análise foi conduzida com todas as regiões

sequenciadas, com exceção do ANT e do La1, por causa do baixo polimorfismo, e do modo de evolução que desvia do modelo de sítios infinitos, respectivamente.

Foram realizadas duas corridas utilizando diferentes sementes randômicas. Cada cadeia consistiu de $2,5 \times 10^8$ gerações, sendo 10 % desse valor eliminado como *burn-in*. Essas corridas foram conduzidas no Portal CIPRES v. 3.1 (disponível em: http://www.phylo.org/sub_sections/portal/) (MILLER et al., 2010). O *mixing* e convergência entre cadeias foram detectados no Tracer v. 1. 6 (disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>), pela análise de ESS. Todos os valores de ESS superaram 200. A representação gráfica de *Bayesian Skygrid* foi produzida com o uso dos *scripts* mencionados em Heled (2010).

Por último, análises de “*Bayesian skyline*” frequentemente produzem trajetórias de tamanhos efetivos crescentes, mas que nem sempre são os cenários mais prováveis em comparação a modelos de população de tamanho constante (e. g. O’ BRIEN et al., 2013). Por esse motivo, foram conduzidas comparações de *Bayesian skygrid* contra um cenário de população constante, (as estimativas de população constante foram produzidas no Beast v. 1.8, seguindo os mesmos parâmetros descritos acima). As comparações entre os dois cenários foram realizadas por meio de Fator de Bayes (BF), com as probabilidades marginais geradas por *Path Sampling* (PS) e *Stepping-Stone* (SS) *Sampling* (BAELE et al., 2012), empregando 6×10^6 gerações, 100 *paths*, com amostragem a cada intervalo de 1000.

RESULTADOS

Caracterização dos Bancos de dados e Diversidade genética

No presente estudo foram sequenciados 12 fragmentos (três mitocondriais e nove nucleares), totalizando 4.224 pares de bases, sendo 2.526 pb referentes a regiões nucleares e 1698 pb correspondentes a segmentos mitocondriais (Tabela 2). O número de indivíduos sequenciados (N), o tamanho dos fragmentos obtidos (pb), o número de haplótipos (Nh) e o número de sítios polimórficos (S), estão listados na Tabela 2.

Para as bases de dados mitocondriais, foram encontrados altos níveis de diversidade genética, sendo que estes permaneceram entre $0,787 \pm 0,033$ (ND4) - $0,997 \pm 0,001$ (RC) para a diversidade haplotípica, e entre $0,003 \pm 0,002$ (ND4) - $0,029 \pm 0,014$ (RC) para os valores de diversidade nucleotídica (Tabela 2). Da mesma maneira, também foram observados elevados níveis de variação genética para a maioria das regiões nucleares, sendo que os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica

variaram entre $0,099 \pm 0,030$ (ANT) - $0,983 \pm 0,002$ (S7); $0,0003 \pm 0,0006$ (ANT) - $0,019 \pm 0,011$ (RPL3), respectivamente (**Tabela 2**). Não foram encontrados evidências de recombinação intragênica.

Estrutura Genética populacional

As relações genealógicas entre os haplótipos denotam um padrão difuso, sendo que estes apresentam-se distribuídos de maneira aleatória ao longo da área de estudo (**Figura 2**), indicando assim uma possível homogeneidade genética para a área do presente estudo. Adicionalmente, os estimadores clássicos de conectividade entre populações são congruentes ao demonstrarem um elevado grau de conectividade genética horizontal ao longo de toda a região estudada. Por exemplo, para quase todas as comparações de F_{ST} par-a-par realizadas, foram obtidos valores baixos e não significativos (exceto para a comparação entre CNB1 x Ceará, para o GH 5- $F_{ST} = 0,067$) (**Figura 3**). Da mesma forma, para a AMOVA a maioria da variância dos dados é atribuída ao componente de variação dentro de populações e não entre estas. Com exceção ao GH5, todos os valores de Φ_{st} global apresentam-se como baixos e não significativos (**Figura 4**).

Por fim, um cenário com grande homogeneidade genética ao longo da região estudada também é corroborado pela atribuição bayesiana de indivíduos, sendo o cenário com um único agrupamento fortemente suportado (Structurama $K_1 = 0,94$; Structure $K=1$ - **Figura 5**), sendo desse modo ressaltada a existência de vastos níveis de homogeneidade genética para *L. purpureus* ao longo da costa brasileira.

Neutralidade e Demografia histórica

Em relação aos estimadores de neutralidade, foram observados valores negativos e significantes para o D e F_s , em todos os marcadores mitocondriais (**Tabela 2**). Para as regiões nucleares, a maioria dos segmentos analisados apresentou valores negativos e significantes de F_s (**Tabela 2**). Já para o D, somente foram encontrados desvios significantes do modelo neutro para o ANT (-1,321; $p < 0,05$) e para o La1(-2,147; $p < 0,05$). Apesar disso, um evento de expansão populacional não pode ser descartado, uma vez que marcadores autossômicos normalmente são menos sensíveis para detectar eventos de oscilações demográficas, devido o maior tamanho efetivo em comparação com o DNA mitocondrial, além disso, o F_s ainda apresenta um maior poder estatístico

para a detecção de desvios de neutralidade causados por oscilações demográficas (FU, 1997).

Ainda em relação à questão demográfica, a comparação de probabilidades marginais entre *Bayesian skygrid* e população constante forneceu uma forte evidência em favor do modelo de *Skygrid* (Fator de Bayes para *Skygrid* ≥ 30 ; **Figura 6**) (KASS & RAFTERY, 1995). A análise de *Bayesian Skygrid* demonstrou um aumento de cerca de cinco vezes no tamanho efetivo de *L. purpureus*, iniciado provavelmente há cerca de 170 mil anos (**Figura 7**), sendo que este evento de expansão demográfica pode ser associado a processos de subida e descida do nível do mar ocorrido no pleistoceno, uma vez que essa datação é congruente com um período de máxima glacial ocorrido no Atlântico Tropical (ver BARRETO et al., 2002).

DISCUSSÃO

Diversidade genética

Historicamente estimadores de diversidade genética vêm sendo amplamente mencionados como indicadores de adaptabilidade e persistência de populações naturais (HARE et al., 2011), existindo vários exemplos onde existe uma relação direta entre níveis de diversidade genética e o tamanho efetivo populacional (revisado em MCCUSKER & BENTZEN, 2010).

No presente estudo foram encontrados elevados níveis de diversidade genética em grande parte das regiões genômicas analisadas. Trata-se de um padrão bastante similar ao observado em outros organismos marinhos (ver DEWOODY & AVISE, 2000), incluindo membros da mesma Família, como *Lutjanus campechanus* (GARBER et al., 2004), *Ocyurus chrysurus* (VASCONCELLOS et al., 2008), e conforme o já relatado para a própria espécie por Gomes et al. (2012).

O pargo *L. purpureus*, no entanto, possui um histórico de mais de meio século de intensa pressão pesqueira, (RESENDE et al., 2003), e para tais espécies existem diversos exemplos que retratam comprometimento da diversidade genética em decorrência da sobrepesca (ver PINSKY & PALUMBI, 2014). Essa tendência, no entanto, parece ser mais evidente em espécies possuidoras de pequenos N_e , (e.g. algumas centenas), e que apresentam alguma subdivisão populacional (PINSKY & PALUMBI, 2014), e certamente este não é o cenário para *L. purpureus* na costa

brasileira, pois, aparentemente possui elevado tamanho efetivo, o que não significa ausência de efeitos da pesca sobre as populações. Para espécies que são excessivamente exploradas pela pesca, vários métodos de estimativa de tamanho efetivo parecem não retratar os valores de tamanho populacional contemporâneo, refletindo ainda a dinâmica populacional existente em épocas pré-exploração (*e. g.* ALTER et al., 2007). Além disso, mesmo aquelas populações que possuem elevados N_e contemporâneos, mostram-se mais susceptíveis à perda de alelos com a retirada excessiva de indivíduos, em comparação com populações que apresentam menores N_e (ALLENDORF et al., 2014). Dessa forma, não seria coerente descartar os efeitos que a pesca excessiva pode assumir sobre os estoques de *Lutjanus purpureus*, apesar dos elevados níveis de diversidade genética observados.

Estrutura populacional e Conectividade genética

No presente estudo, tanto as estatísticas F , quanto os métodos de atribuição bayesiana, fortemente suportaram um cenário de homogeneidade genética para *L. purpureus* do Atlântico Sul Ocidental. Para várias espécies marinhas este cenário de elevada conexão genética é atribuído principalmente à aparente ausência de barreiras a dispersão (PALUMBI, 1994). Adicionalmente, traços de vida das espécies possuem influência direta na manutenção da conectividade genética entre populações. Por exemplo, a extensão da Duração Pelágica Larval (PLD), tipo de ovo (pelágicos) vêm sendo historicamente mencionados como promotores da conectividade genética no ambiente marinho (DAWSON, 2014; PLANES, 2002; SHULMAN & BERMINGHAM, 1995), além do mais, espécies que apresentam distribuições verticais mais profundas, aparentemente demonstram níveis mais elevados de conectividade genética, em comparação à espécies pelágicas (SELKOE et al., 2014).

Indivíduos de *L. purpureus* normalmente são encontrados sobre o talude (FURTADO-JÚNIOR & BRITO, 2002), em profundidades de até 160 metros (ALLEN, 1985). A desova ocorre sobre a plataforma continental, sendo que os ovos são do tipo pelágico (FONTELES-FILHO, 2000). Em relação à duração do desenvolvimento pelágico larval inicial, não existem dados disponíveis, mas provavelmente a espécie apresenta um desenvolvimento larval de aproximadamente 30 dias, que é bastante comum para lutjanídeos do Atlântico tropical (LINDEMAN et al., 2001) e, desse modo às larvas permanecem por um longo tempo passivas a ação de correntes oceânicas

(LINDEMAN et al., 2001). Portanto, essas características são congruentes com os elevados níveis de conectividade genética aqui apresentados, e conforme o previamente relatado para este espécie (GOMES et al., 2008; 2012).

Adicionalmente, correntes oceânicas parecem exercer um papel fundamental sobre a conectividade genética no Atlântico Tropical (*e.g.* BENEVIDES et al., 2014;; SANTOS et al., 2003; 2006). Nessa região, a dinâmica de circulação oceânica é influenciada principalmente pela bifurcação da Corrente Sul Equatorial, originando a Corrente do Brasil e a Corrente Norte do Brasil (PETERSON & STRAMMA, 1991). No entanto, para vários grupos, essa ramificação parece não ser uma barreira efetiva ao fluxo gênico (BOEHM et al., 2013; RODRÍGUEZ-REY et al., 2014; WIEMAN et al., 2013).

Essas duas correntes oceânicas apresentam ligeiras alterações sazonais (ver http://www.aoml.noaa.gov/phod/graphics/dacdata/seasonal_brazil.gif), o que pode facilitar a conectividade ao longo da região estudada. Além disso, informações coletadas de derivadores, demonstram que objetos flutuantes podem percorrer a mesma região estudada em pouco mais de um mês (**Anexo I**), e dessa forma seria possível a manutenção da conectividade genética ao longo da região por dispersão larval, mediada pela ação de correntes. Assim, todas essas informações são condizentes com um cenário de intensa homogeneidade genética aqui demonstrado.

Vale ressaltar que peixes marinhos normalmente apresentam elevados tamanhos efetivos (DEWOODY & AVISE, 2000; HORNE & VAN HERWERDEN, 2013; MCCUSKER & BENTZEN, 2010), e desse modo, mesmo em populações que apresentam alguma restrição de fluxo gênico, marcadores moleculares de evolução “neutra” podem falhar em demonstrar diferenciação genética (HORNE & VAN HERWERDEN, 2013), uma vez que para marcadores neutros, existe uma relação inversa entre *lineage sorting* e tamanho efetivo. Dessa forma, para um cenário de homogeneidade genética, conforme o encontrado no presente estudo é difícil a distinção entre populações com históricos de recentes e/ou com sutis quebras genéticas, daquelas que apresentam um cenário contínuo de panmixia.

Demografia Histórica

Investigações sobre demografia histórica de diversos organismos marinhos vêm demonstrando situações onde eventos climáticos históricos promoveram processos de contração e/ou expansão em populações, sendo vários destes já relatados para lutjanídeos, como *Lutjanus erythropterus* (ZHANG et al., 2006b), *Lutjanus campechanus* (PRUETT et al., 2005), *Ocyurus chrysurus* (Grazielle Gomes, comunicação pessoal), assim como *L. purpureus* (GOMES et al., 2008; 2012). No presente estudo, são também visualizadas várias evidências favoráveis a um cenário de expansão histórica do tamanho efetivo de *L. purpureus*.

Foram encontrados valores negativos e significantes dos testes de neutralidade para boa parte dos *loci* aqui utilizados, o que pode estar associado a desvios de neutralidade causados por expansão populacional (*e. g.* RAY et al., 2003). Sabe-se, no entanto, que oscilações demográficas e seleção apresentam assinaturas similares em uma dada genealogia (NIELSEN, 2005), porém, os efeitos da seleção apresentam-se restritos a porções do genoma. Em contrapartida, oscilações demográficas afetam o genoma de maneira mais uniforme (NIELSEN, 2005), e neste sentido, ao se analisar múltiplos *loci*, seria possível distinguir processos demográficos estocásticos daqueles causados por seleção (FAHEY et al., 2014).

Nem todos os testes e /ou regiões genômicas demonstraram desvios do modo neutro de evolução. Assim, uma possível explicação seria que os valores negativos e significativos do F_s e D , aqui demonstrados, são resultantes de seleção e não de oscilações de tamanho efetivo. Porém, vale ressaltar que devido ao N_e quatro vezes maiores em comparação ao DNA mitocondrial, os *loci* autossômicos retratam histórias evolutivas ancestrais, e dessa forma, regiões autossômicas geralmente falham em demonstrar desvios de neutralidade causados por oscilações populacionais (FAHEY et al., 2014; PTAK & PRZEWORSKI, 2002). Com isso, o cenário de expansão demográfica e desvio em parte dos estimadores de neutralidade (*i. e.* somente os marcadores mitocondriais) é bastante comum em vários grupos de vertebrados (FAHEY et al., 2014).

A análise de *Bayesian Skygrid* demonstrou nitidamente uma curva de aumento no tamanho efetivo de cerca de cinco vezes, (sendo este cenário altamente suportado pela comparação de probabilidades marginais) iniciado há aproximadamente 170 mil anos, sendo esta datação congruente comum período de máxima glacial (BARRETO et al., 2002). Da mesma forma, tem sido relatado que para o Atlântico, vários outros Teleosteos, incluindo lutjanídeos, aparentemente experimentaram eventos de expansão

demográfica decorrentes de oscilações do nível do mar no pleistoceno. É o caso de *Cynoscion guatucupa* (FERNÁNDEZ IRIARTE et al., 2011), *O. chrysurus* e *Lutjanus synagris* (Grazielle Gomes, comunicação pessoal).

Devido à diminuição dos níveis dos mares, grandes porções de plataforma continental permaneceram expostas, reduzindo a disponibilidade de habitat e recursos para espécies costeiras (ALLCOCK & STRUGNELL, 2012). Espécies cujas dinâmicas populacionais foram fortemente afetadas por eventos de glaciações normalmente apresentam valores reduzidos de diversidade genética, assim como genealogias rasas e em formato de estrela (ALLCOCK & STRUGNELL, 2012), um cenário bastante diferente do encontrado para *L. purpureus*, que apresenta elevados índices de diversidade genética para a maioria dos *loci* amostrados. No entanto, exemplares de *L. purpureus* são frequentemente encontrados sobre o talude, em profundidades de até 130 metros (FURTADO-JÚNIOR & BRITO, 2002), e dessa forma, qualquer evento de descida do nível do mar teria uma influência reduzida sobre disponibilidade de recursos para esta espécie, e, portanto o impacto de eventos de máxima glacial sobre os níveis de variação genética e dinâmica populacional histórica seriam diminutos, em comparação a espécies com distribuições mais costeiras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para *L. purpureus*, o presente estudo é o mais expressivo em relação ao número de segmentos genômicos analisados. Marcadores moleculares vêm providenciando inúmeras informações acerca da dinâmica populacional histórica em vários grupos de organismos (e. g. FUNK et al., 2012). Para espécies que são altamente visadas pela pesca comercial, esses dados são imprescindíveis para um melhor entendimento dos efeitos da sobrepesca sobre os estoques naturais (OVENDEN et al., 2013).

Os resultados demonstraram que *L. purpureus* mantém elevados níveis de diversidade genética, certamente um reflexo do elevado tamanho efetivo apresentado pela espécie. No entanto, esses achados não podem ser entendidos como ausência de efeitos da sobrepesca nas populações do pargo, haja vista que esta é uma atividade recente, e dado o elevado tamanho efetivo apresentado pela espécie, os efeitos dessa atividade sobre a diversidade genética podem ser não detectáveis. Em adição, ao longo da região estudada, *L. purpureus* demonstra homogeneidade genética, o que pode

contribuir para os elevados níveis de diversidade genética aqui encontrados (DEWOODY & AVISE, 2000).

Ainda em relação a homogeneidade genética, para espécies que apresentam elevados tamanhos efetivos, é difícil a distinção entre cenários contínuos de panmixia e recentes e/ou sutis interrupções de fluxo gênico (i. e. eurimixia *sensu* Dawson et al., (2011)). Apesar disso, níveis de homogeneidade genética no ambiente marinho são frequentemente relatados para espécies que da mesma maneira que *L. purpureus* apresentam um período inicial de dispersão larval e desova em mar aberto (DAWSON, 2014; SHULMAN & BERMINGHAM, 1995). Assim esses fatores parecem suportar a aparente homogeneidade genética horizontal ao longo da região estudada.

Por último, as inferências demográficas aqui conduzidas demonstraram que as “populações” de *L. purpureus* experimentaram um evento de expansão demográfica, que possivelmente foi causado por oscilações do nível do mar que ocorreram durante do pleistoceno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLCOCK, A L.; STRUGNELL, J. M. Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 9, p. 520–528, 2012.

ALLEN, G.-R. **Snappers of the World. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date.** Vol 6. Rome: FAO., 208 p, 1985.

ALLENDORF, F. W.; BERRY, O.; RYMAN, N. So long to genetic diversity, and thanks for all the fish. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 23–25, 2014.

ALTER, S. E.; RYNES, E.; PALUMBI, S. R. DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 38, p. 15162–15167, 2007.

AREVALO, E.; DAVIS, S. K.; SITES, J. W. Society of Systematic Biologists Mitochondrial DNA Sequence Divergence and Phylogenetic Relationships among Eight Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) in Central. **Systematic Biology**, v. 43, n. 3, p. 387–418, 1994.

BAELE, G. et al. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 9, p. 2157–2167, 2012.

BARRETO, A. M. et al. Late Pleistocene marine terrace deposits in northeastern Brazil: sea-level change and tectonic implications. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 179, n. 1, p. 57–69, 2002.

BENEVIDES, E. A. et al. When physical oceanography meets population genetics: The case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 255–266, 2014.

BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **The Annals of Statistics**, v. 29, n. 4, p. 1165–1188, 2001.

BIELAWSKI, J. P.; GOLD, J. R. Mutation patterns of mitochondrial H- and L-strand DNA in closely related Cyprinid fishes. **Genetics**, v. 161, n. 4, p. 1589–1597, 2002.

BLEL, H. et al. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Selection footprint at the first intron of the Prl gene in natural populations of the flathead mullet (*Mugil cephalus*, L. 1758). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 387, p. 60–67, 2010.

BOEHM, J. T. et al. Marine dispersal and barriers drive Atlantic seahorse diversification. **Journal of Biogeography**, v 40, p 1839-1849, 2013.

BRUEN, T. C.; PHILIPPE, H.; BRYANT, D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2665–2681, 2006.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela**. 2. ed. Caracas, Venezuela: Fundacion Científica Los Roques, v. II, p. 498, 1993.

CERVIGÓN, F. et al. **FAO species identification sheets for fishery purpose. Field Guide to the Commercial marine and Brackish-water Resources of the Northern Coast of South America**. Rome: FAO, p. 513, 1993.

CHANG, C.-T. et al. Mixed sequence reader: a program for analyzing DNA sequences with heterozygous base calling. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 365104, 2012.

CHOW, S.; HAZAMA, K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1247–1263, 1998.

CLARK, A G. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 111–122, 1990.

DAWSON, M. N. et al. Phylogeography of *Emerita analoga* (Crustacea, Decapoda, Hippidae), an eastern Pacific Ocean sand crab with long-lived pelagic larvae. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 8, p. 1600–1612, 2011.

DAWSON, M. N. Natural experiments and meta-analyses in comparative phylogeography. **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 1, p. 52–65, 2014.

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

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2011.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FAHEY, A. L.; RICKLEFS, R. E.; DEWOODY, J. A. DNA-based approaches for evaluating historical demography in terrestrial vertebrates. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 112, n. 3, p. 367–386, 2014.

FERNÁNDEZ IRIARTE, P. J. et al. Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. **Scientia Marina**, v. 75, n. 4, p. 701–706, 2011.

FLOT, J.-F. Seqphase: a Web Tool for Interconverting Phase Input/Output Files and Fasta Sequence Alignments. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 162–166, 2010.

FONTELES - FILHO, A. A. **Síntese sobre a distribuição, Abundância, Potencial Pesqueiro, e Biologia do pargo, *Lutjanus purpureus*, Poey da Zona Econômica Exclusiva do Nordeste do Brasil**. Brasília: p 25, 2000.

FU, Y.-X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.

FUNK, W. C. et al. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 9, p. 489–496, 2012.

FURTADO-JÚNIOR, I.; BRITO, C. S. F. Biologia e pesca do pargo *Lutjanus purpureus*, Poey, 1875 (Pisces: Lutjanidae), na região Norte do Brasil. **Bol. Téc. Cient. Cepnor.**, v. 2, p. 173–190, 2002.

GARBER, A. F.; TRINGALI, M. D.; STUCK, K. C. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic coast of Florida as determined from mitochondrial DNA control region sequence. **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 175–185, 2004.

GILL, M. S. et al. Improving Bayesian Population Dynamics Inference : A Coalescent-Based Model for Multiple Loci. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 713–724, 2013.

GOMES, G. et al. Can *Lutjanus purpureus* (South red snapper) be “legally” considered a red snapper (*Lutjanus campechanus*)? **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 372–376, 2008.

GOMES, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Population structure of *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae - Perciformes) on the Brazilian coast: further existence evidence of a single species of red snapper in the western Atlantic. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 979–999, 2012.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARE, M. P. et al. Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. **Conservation Biology : The Journal of the Society for Conservation Biology**, v. 25, n. 3, p. 438–449, 2011.

HASSAN, M. et al. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 334–340, 2002.

HELED, J. **Extended Bayesian Skyline Plot tutorial**.. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/tutorials>>, p. 16, 2010.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 289, p. doi:10.1186/1471-2148-8-289, 2008.

HORNE, J. B.; VAN HERWERDEN, L. Long-term panmixia in a cosmopolitan Indo-Pacific coral reef fish and a nebulous genetic boundary with its broadly sympatric sister species. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 4, p. 783-799, 2013.

HUELSENBECK, J. P.; ANDOLFATTO, P.; HUELSENBECK, E. T. Structurama: bayesian inference of population structure. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 7, p. 55-59, 2011.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

JARMAN, S. N.; WARD, R. D.; ELLIOTT, N. G. Oligonucleotide primers for PCR amplification of Coelomate introns. **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 347-355, 2002.

KASS, R. E.; RAFTERY, A. E. Bayes Factors. **Journal of the American Statistical Association**, v. 90, n. 430, p. 773-795, 1995.

LEE, W.-J. et al. Structure and evolution of Teleost mitochondrial control regions. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 1, p. 54-66, 1995.

LINDEMAN, K. C. et al. Transport of Larvae Originating in Southwest Cuba and Dry Tortugas: Evidence for Retention in Grunts and Snappers. **Proceedings of the 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 52, p. 732-747, 2001.

MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 22, p. 4852-4862, 2010.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 1-8, 2010.

MOURA, R. L.; LINDEMAN, K. C. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*. **Zootaxa**, v. 43, p. 31-43, 2007.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia Univ. Press. 512 p, 1987.

NIELSEN, E. E. et al. Genomic signatures of local directional selection in a high gene flow marine organism; the Atlantic cod (*Gadus morhua*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 276, 2009.

NIELSEN, R. Molecular signatures of natural selection. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 197–218, 2005.

NIELSEN, R.; BEAUMONT, M. A. Statistical inferences in phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1034–1047, 2009.

O' BRIEN, S. M.; GALLUCCI, V. F.; HAUSER, L. Effects of species biology on the historical demography of sharks and their implications for likely consequences of contemporary climate change. **Conservation Genetics**, v. 14, p. 125–144, 2013.

OVENDEN, J. R. et al. Ocean 's eleven : a critical evaluation of the role of population , evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. **Fish and Fisheries**, p. 1–35, 2013.

PALUMBI, S. R. Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, n. 1, p. 547–572, 1994.

PETERSON, R. G.; STRAMMA, L. Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. **Prog. Oceanog.**, v. 26, p. 1–73, 1991.

PINHO, C. et al. New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, p. 181–185, 2009.

PINSKY, M. L.; PALUMBI, S. R. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 29–39, 2014.

PLANES, S. Biogeography and Larval Dispersal Inferred from Population Genetic Analysis. In: SALE, P. (Ed.) **Coral reef fishes: dynamics and diversity in a complex ecosystem**. New York, USA: Academic Press, 2002. p. 201–220.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

PRUETT, C. L.; SAILLANT, E.; GOLD, J. R. Historical population demography of red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the northern Gulf of Mexico based on analysis of sequences of mitochondrial DNA. **Marine Biology**, v. 147, n. 3, p. 593–602, 2005.

PTAK, S. E.; PRZEWORSKI, M. Evidence for population growth in humans is confounded by fine-scale population structure. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 11, p. 559–563, 2002.

RAMÍREZ-SORIANO, A. et al. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics**, v. 179, n. 1, p. 555–567, 2008.

RAY, N.; CURRAT, M.; EXCOFFIER, L. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 76–86, 2003.

RESENDE, S. M.; FERREIRA, B. P.; FREDOU, T. A pesca de Lutjanídeos no Nordeste do Brasil: Histórico das Pescarias, Características das Espécies e Relevância para o Manejo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v. 11, p. 257–270, 2003.

RODRIGUES-FILHO, L. F. S. **Identificação e Filogeografia de Tainhas do Gênero Mugil e avaliação do estado taxonomico das espécies *Mugil liza Valenciennes, 1836* e *Mugil platanus Günther, 1880***. Universidade Federal do Pará. 116 p, 2011.

RODRÍGUEZ-REY, G. T.; SOLÉ-CAVA, A. M.; LAZOSKI, C. Genetic homogeneity and historical expansions of the slipper lobster, *Scyllarides brasiliensis*, in the south-west Atlantic. **Marine and Freshwater Research**, v. 65, n. 1, p. 59–69, 2014.

SALZBURGER, W.; EWING, G. B.; VON HAESELER, A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. **Molecular ecology**, v. 20, n. 9, p. 1952–1963, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, S. et al. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4361–4373, 2006.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae , Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. v. 161, p. 151–161, 2003.

SCHWARZ, G. Estimating the Dimension of a Model. **Annals os Statistics**, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.

SELKOE, K. A. et al. Emergent patterns of population genetic structure for a coral reef community. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 12, p. 3064–3079, 2014.

SEVILLA, R. G. et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 5, p. 730–734, 2007.

SHULMAN, M. J. .; BERMINGHAM, E. Early Life Histories , Ocean Currents , and the Population Genetics of Caribbean Reef Fishes. **Evolution**, v. 49, n. 5, p. 897–910, 1995.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American journal of human genetics**, v. 73, n. 5, p. 1162–1169, 2003.

SWOFFORD, D. L. PAUP, **Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods. Beta Version V 4.10b**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, p. 142 2002.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–95, 1989.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

VASCONCELLOS, A. V et al. Genetic and morphometric differences between yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*, Lutjanidae) populations of the tropical West Atlantic. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 308–316, 2008.

WANG, L. et al. Population genetic studies revealed local adaptation in a high gene-flow marine fish, the small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*). **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e83493, 2013.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics For Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358–1370, 1984.

WIEMAN, A. C. et al. A panmictic fiddler crab from the coast of Brazil? Impact of divergent ocean currents and larval dispersal potential on genetic and morphological variation in *Uca maracoani*. **Marine Biology**, v. 161, n. 1, p. 173–185, 2013.

ZHANG, J.; CAI, Z.; HUANG, H. Isolation and characterization of microsatellite loci from mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 408–411, 2006a.

ZHANG, J.; CAI, Z.; HUANG, L. Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region. **ICES Journal of Marine Science**, v. 63, n. 4, p. 693–704, 2006b.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representativo da distribuição espacial dos pontos de coleta dos espécimes de *Lutjanus purpureus* utilizados no presente estudo. CNB1- Costa Norte do Brasil 1 (Pará e Amapá). CNB2- Costa Norte do Brasil 2 (Maranhão).

Figura 2. Relações genealógicas entre haplótipos para todos os *loci* utilizados no presente estudo. Cada círculo representa um haplótipo, sendo a área do proporcional a frequência do haplótipo. Cores referem-se às localidades de coleta.

Figura 3. Comparações de F_{st} par-a-par entre as localidades de amostragem, e para todos os *loci* utilizados no presente estudo. Círculos abertos representam valores de F_{st} não significantes após a correção de FDR (i.e. $p > 0,02$). Círculo preenchido representa $p < 0,02$ (GH5).

Figura 4. Proporção da variância (em porcentagem) entre populações, quando todas as localidades aqui amostradas são agrupadas em uma única estrutura. * - Valor associado a Φ_{st} significativa ($p < 0,05$).

Figura 5. Distribuição dos valores de probabilidade média dos dados (em Ln), para cada valor de K aqui estimado (1-6). Percebe-se maiores valores de probabilidade, assim como uma menor variância, quando $K=1$.

Figura 6. Estimativas dos valores de probabilidades marginais, inferidas por meio de *Path Sampling* (PS) e *Stepping-Stone* (SS) *Sampling*. Valores do eixo y representam probabilidade marginal (em Ln). Asteriscos simbolizam uma forte evidencia (i. e. Fator de Bayes > 10 , de acordo com Kass & Raftery (1995)) favorável a um dos cenários: *SkyGrid* ou população constante.

Figura 7. Dinâmica populacional para *Lutjanus purpureus* da costa brasileira, evidenciada a partir da análise de *Bayesian Skygrid*. Eixo x representa o tempo (em milhões de anos). No eixo y é demonstrado o produto da multiplicação entre tamanho efetivo e o tempo de geração.

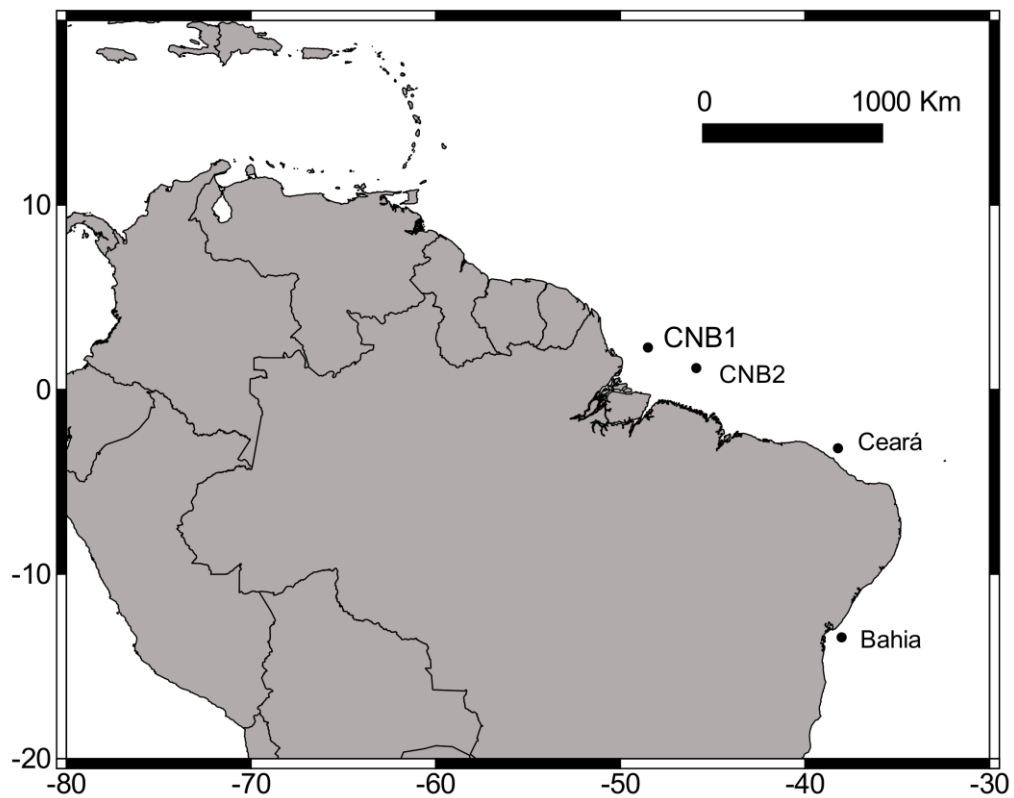


Figura 1. Mapa representativo da distribuição espacial dos pontos de coleta dos espécimes de *Lutjanus purpureus* utilizados no presente estudo. CNB1- Costa Norte do Brasil 1 (Pará e Amapá). CNB2- Costa Norte do Brasil 2 (Maranhão).

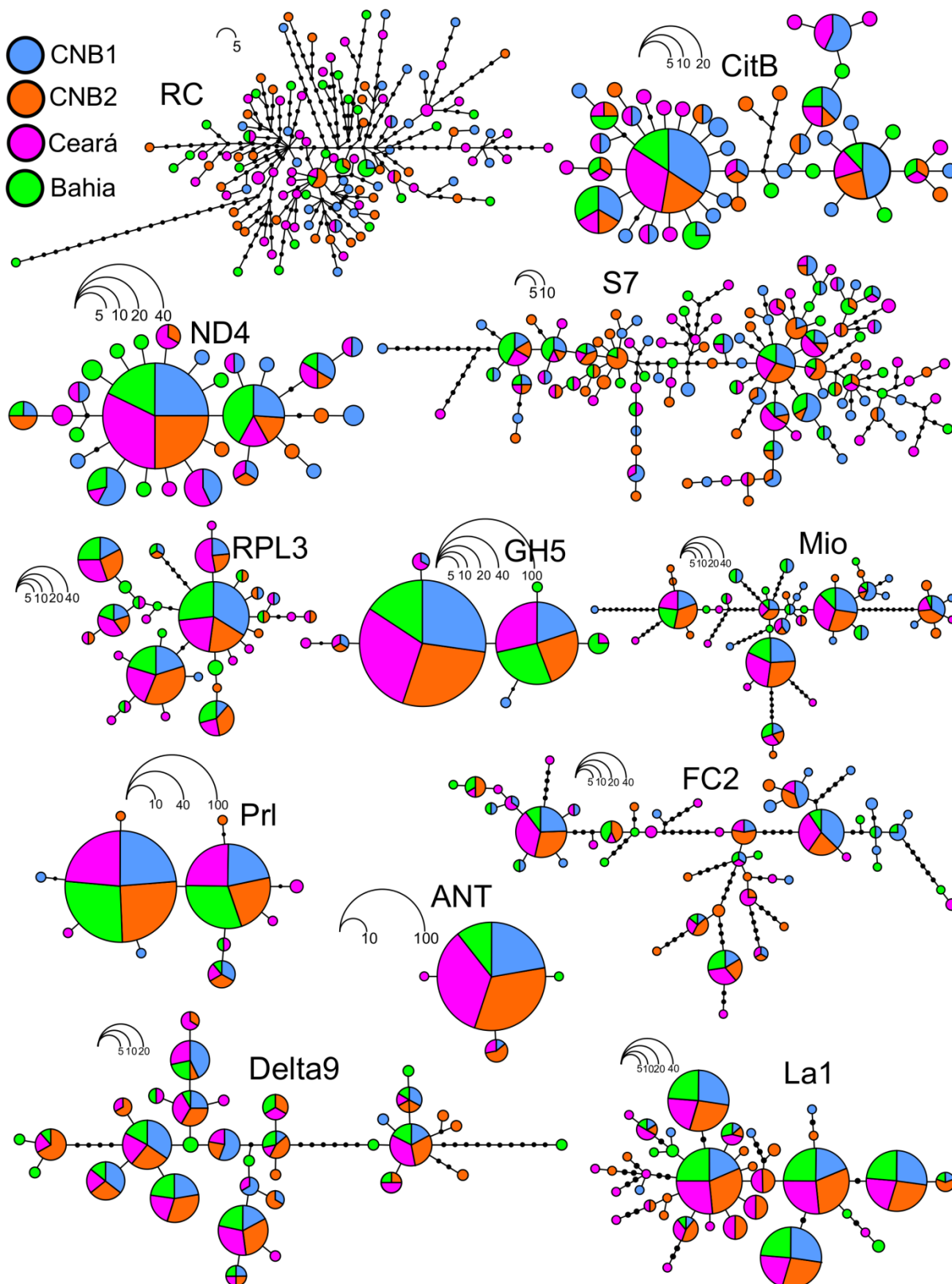


Figura 2. Relações genealógicas entre haplótipos para todos os *loci* utilizados no presente estudo. Cada círculo representa um haplótipo, sendo a área do proporcional a frequência do haplótipo. Cores referem-se às localidades de coleta.

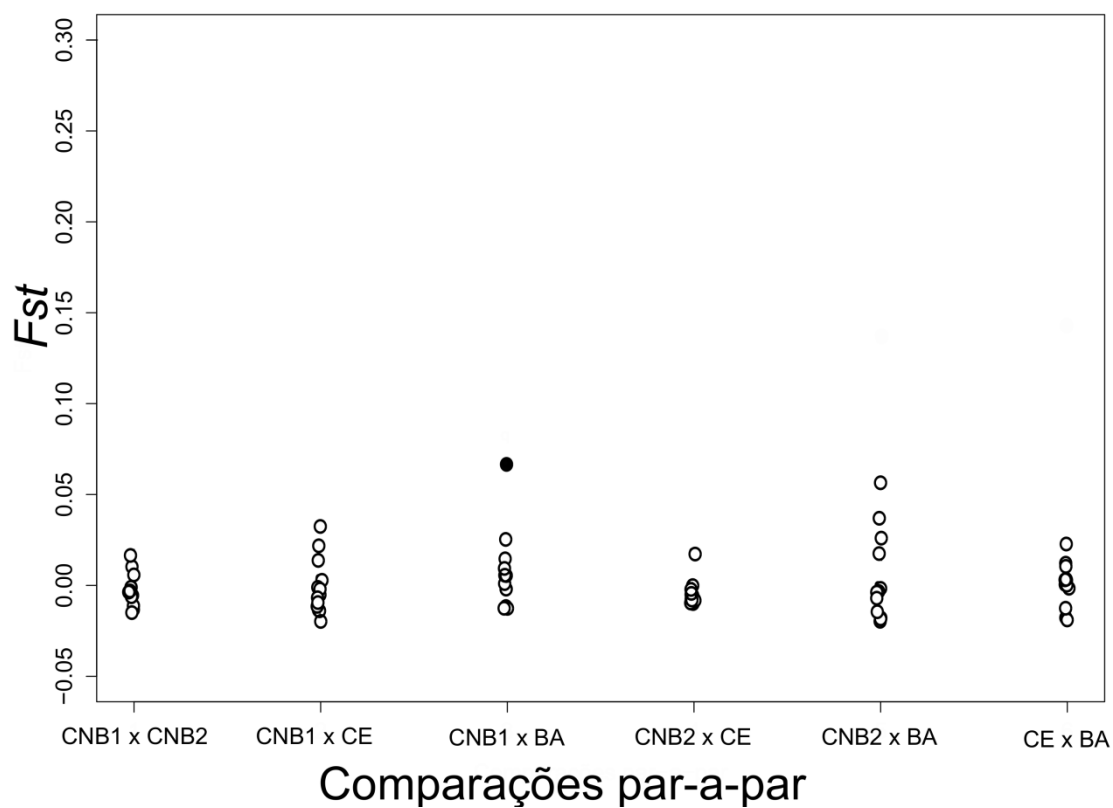


Figura 3. Comparações de F_{st} par-a-par entre as localidades de amostragem, e para todos os *loci* utilizados no presente estudo. Círculos abertos representam valores de F_{st} não significantes após a correção de FDR (i.e. $p > 0,02$). Círculo preenchido representa $p < 0,02$ (GH5).

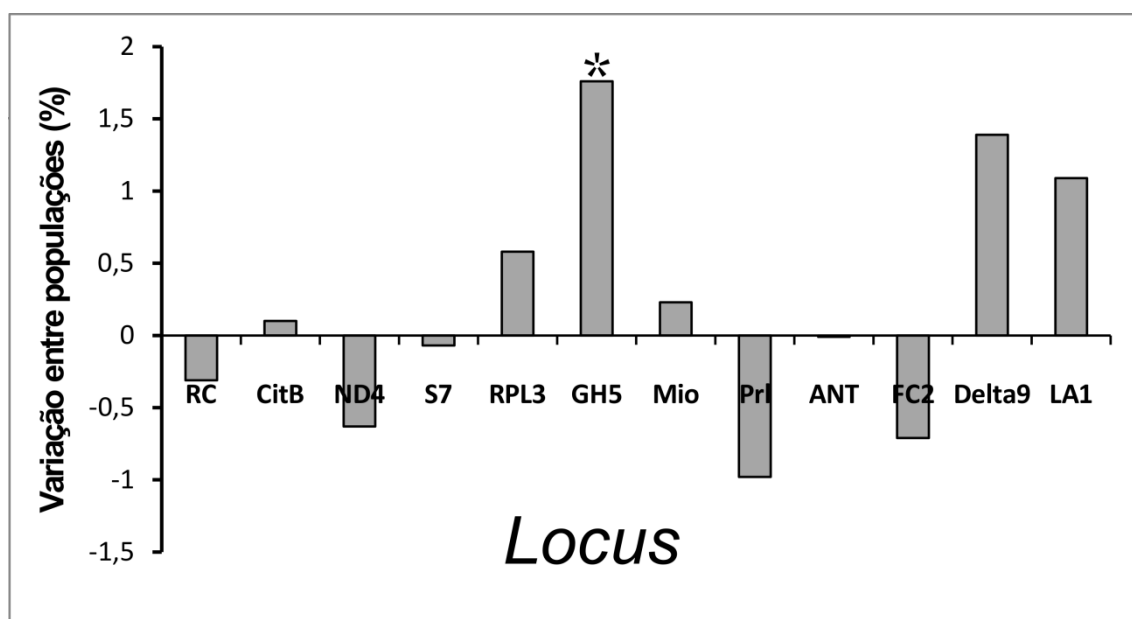


Figura 4. Proporção da variância (em porcentagem) entre populações, quando todas as localidades aqui amostradas são agrupadas em uma única estrutura. * - Valor associado a Φ_{st} significativo ($p < 0,05$).

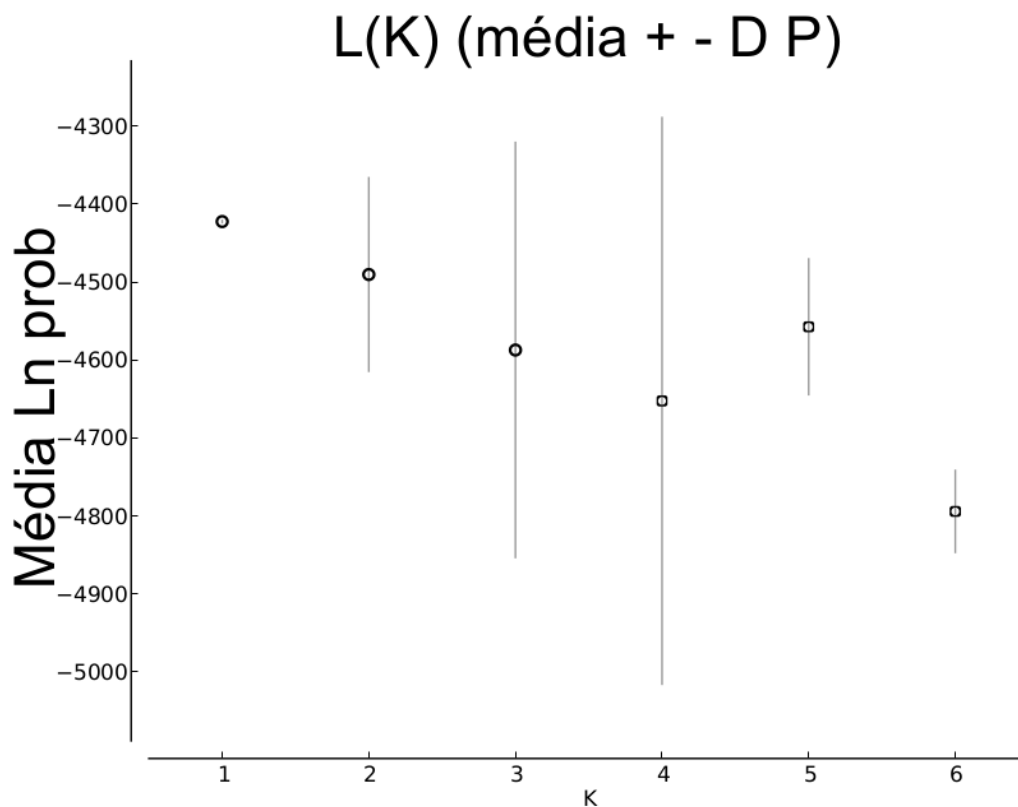


Figura 5. Distribuição dos valores de probabilidade média dos dados (em Ln), para cada valor de K aqui estimado (1-6). Percebe-se maiores valores de probabilidade, assim como uma menor variância, quando $K=1$.

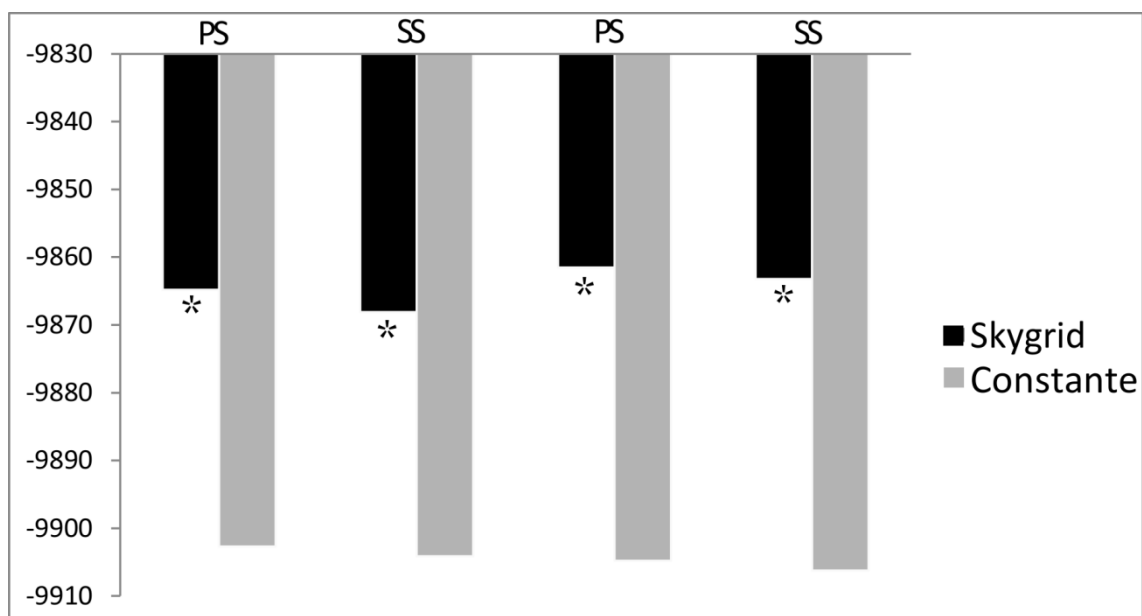


Figura 6. Estimativas dos valores de probabilidades marginais, inferidas por meio de *Path Sampling* (PS) e *Stepping-Stone* (SS) *Sampling*. Valores do eixo y representam probabilidade marginal (em Ln). Asteriscos simbolizam uma forte evidencia (i. e. Fator de Bayes > 10 , de acordo com Kass & Raftery (1995)) favorável a um dos cenários: *SkyGrid* ou população constante.

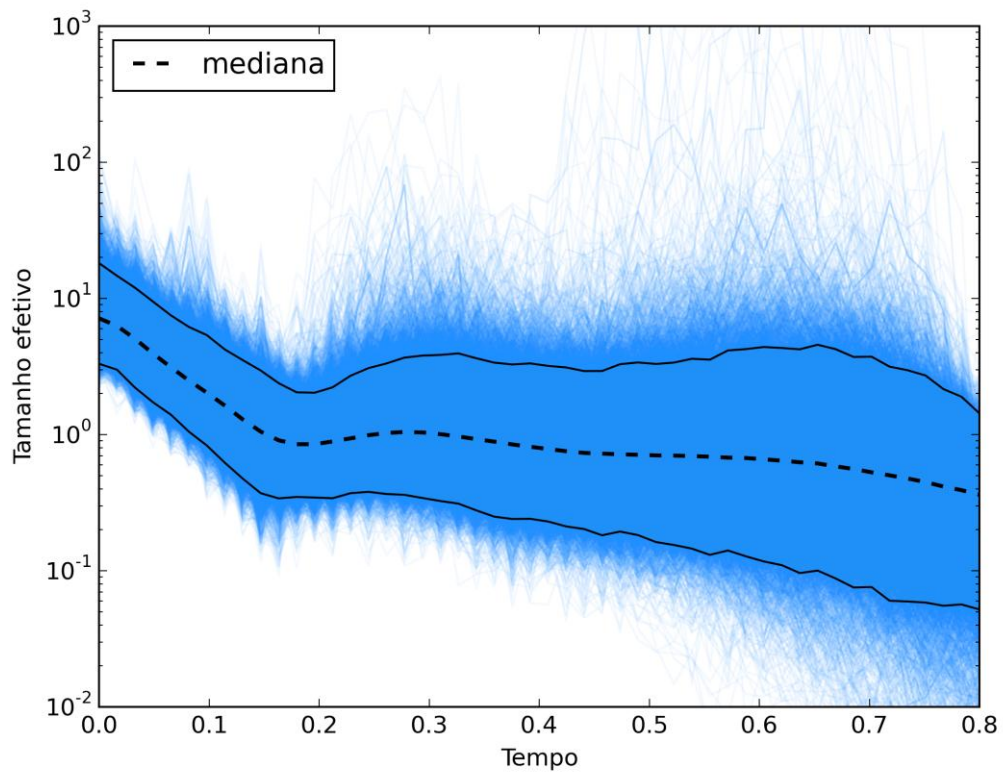


Figura 7. Dinâmica populacional para *Lutjanus purpureus* da costa brasileira, evidenciada a partir da análise de *Bayesian Skygrid*. Eixo x representa o tempo (em milhões de anos). No eixo y é demonstrado o produto da multiplicação entre tamanho efetivo e o tempo de geração.

Tabela 1- Descrição para os iniciadores e condições de amplificação referentes a todos os segmentos genômicos utilizados no presente estudo.

Locus (Abreviação)	Iniciadores	Sequência 5'-3'	Hibridização (°C)	Referência
Região Controle (RC) ^a	A G	TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG CGTCGGATCCCATCTTCAGTGTATGCTT	57	(LEE et al., 1995)
Citocromo B (CitB) ^a	FishCytbF TrucCytbR	ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC CCGACTTCCGGATTACAAGACCG	54	(SEVILLA et al., 2007)
NAD Desidrogenase subunidade 4 (ND4) ^a	ND4LB NAP2	CAAAACCTTAATCTYCTACAATGCT TGGAGCTTCTACGTGRGCTTT	56	(BIELAWSKI & GOLD, 2002) (AREVALO et al., 1994)
Proteína Ribossomal S7- íntron 1 (S7) ^b	S7RPEX1F S7RPEX2R	TGGCCTCTTCCTTGCCGTC AACTCGTCTGGCTTTTCGCC	63	(CHOW & HAZAMA, 1998)
Proteína Ribossomal L3 – íntron 5 (RPL3) ^b	RPL35F RPL36R	AAGAAGTCYCACCTCATGGAGAT TTRCGKGGCAGTTTCTTTGTGTGCCA	57,5	(PINHO et al., 2009)
Hormônio do Crescimento – íntron 5 (GH5) ^b	GH5F GH6R	AGGCCAATCAGGACGGAGC TGCCACTGTCAGATAAGTCTCC	58,5	(HASSAN et al., 2002)
Miostatina- Íntron1 (Mio) ^b	Mio 1F Mio 1R	ATGAGCATGCCATCACAGAG ATGCGATTGGCTTGAAACTT	64	Presente estudo
Prolactina – íntron 1 (Prl) ^b	Prl1F Prl1R	GACAARCTKCACTCBCTCAGCCA TGNAGDGAGGABGTGTGRCAC	63	(BLEL et al., 2010)
ANT – íntron 1 (ANT) ^b	ANTF1 ANTR1	TGCTTCGTNTACCCVCTKGACTTTGC CCAGACTGCATCATCATKCGRCGDC	57	(JARMAN et al., 2002)
Fator do crescimento similar à insulina (FC2) ^b	FCMugilF FCMugilR	G TTCACAGCGCCACACAGAC CTTGAAGGATGAATGACTATGTCCA	66	(RODRIGUES-FILHO, 2011)
Delta 6 desaturase- íntron9 (Delta9) ^b	Delt6 F9 Delt6 R9	T TACTACCTTCGCTACCTGTGCT AGTCACCCACACAAACCAGTKAC	64	Presente estudo
LA1 ^c	La1F La1R	GCTAGCTTTGCATGTTCCC AAGGCCTCGCAGATCAATCG	56	(ZHANG et al., 2006a)

a – Mitochondrial; b- Nuclear (íntron); c- Nuclear (Microsatélite)

Tabela 2- Caracterização dos níveis de polimorfismo e índices de neutralidade para as regiões genômicas aqui utilizadas.

Locus	N	Pb	S	Nh	h ± dp	π ± dp	D	Fu
RC	135	404	145	120	0,997±0,001	0,029±0,014	-1,79*	-24,195*
CitB	139	779	39	44	0,897± 0,01	0,003±0,01	-1,934*	-26,72*
ND4	130	515	27	27	0,787±0,033	0,003±0,002	-1,997*	-23,753*
S7	114	467	56	112	0,983±0,002	0,014±0,007	-0,677	-24,607*
RPL3	118	171	20	28	0,827±0,015	0,019±0,011	-0,217	-8,400
GH5	124	146	8	8	0,479±0,026	0,003±0,003	-1,248	-3,609
Mio	104	367	20	37	0,869±0,012	0,010±0,006	0,394	-16,217*
PRL	129	181	11	11	0,539±0,021	0,003±0,003	-1,284	-5,541
ANT	87	286	3	4	0,099±0,030	0,0003±0,0006	-1,321*	-4,008*
FC2	100	217	21	33	0,935±0,005	0,021±0,011	0,698	-9,022
Delta9	98	563	22	35	0,893±0,012	0,007±0,004	0,144	-13,533*
La1	100	128	24	26	0,476±0,044	0,009±0,006	-2,147*	-24,540*

N-Número de indivíduos, Pb- Comprimento do fragmento, S- Sítios polimórficos, Nh- Número de haplótipos, h- Diversidade haplotípica, π- Diversidade nucleotídica, dp- Desvio padrão, D- D de Tajima (TAJIMA, 1989), Fu- Teste F de Fu (FU, 1997).

CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas em tópicos as principais conclusões (ou resultados) do presente estudo, levando em consideração a divisão de capítulos aqui assumida.

CAPÍTULO II- Desenvolvimento de Marcadores Intragênicos e Aplicabilidade em análises populacionais em Lutjanídeos (Perciformes)

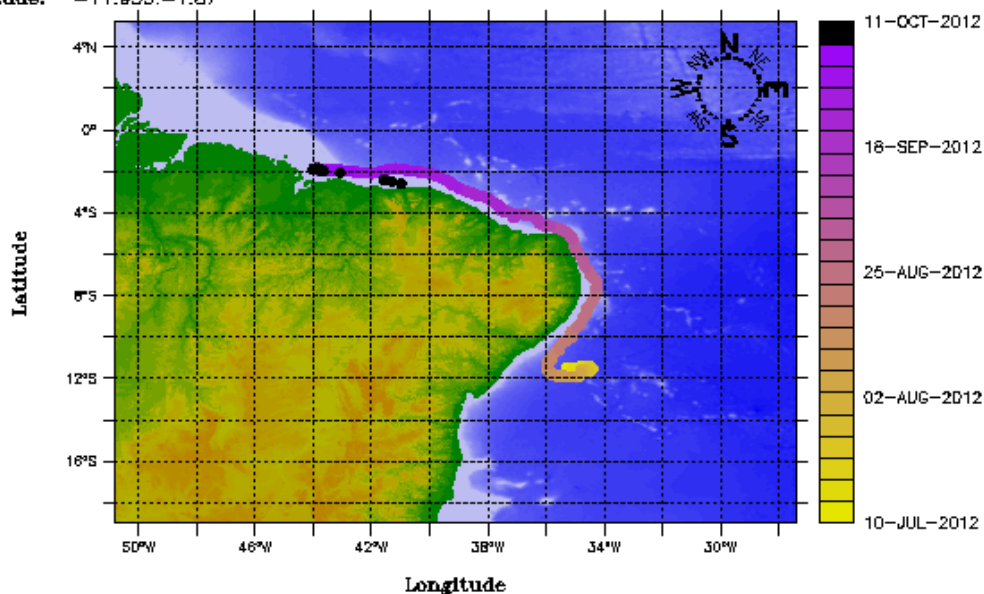
- ✓ Grande parte dos iniciadores aqui desenvolvidos possuem elevados níveis de polimorfismo e, portanto podem ser aplicáveis para investigações genéticas a nível intraespecífico, tanto para *L. purpureus*, como para outras categorias taxonômicas, como Famílias e/ou Ordens;

CAPÍTULO III- Homogeneidade Genética do pargo *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae – Perciformes) do Atlântico Sul Ocidental a partir de análises multilocus

- ✓ *Lutjanus purpureus* apresenta altos níveis de diversidade genética ao longo da região analisada, o que possivelmente é decorrente de um elevado tamanho efetivo apresentado pela espécie;
- ✓ Para *L. purpureus*, encontrou-se um cenário com homogeneidade genética ao longo da região estudada, o que pode ser explicado por traços biológicos da espécie (e. g. local de desova, desenvolvimento pelágico larval);
- ✓ Quanto à demografia histórica, as populações de *L. purpureus* apresentaram um crescimento de cerca de 10 vezes no tamanho efetivo, que possivelmente foi causado por oscilações no nível do mar durante o pleistoceno;

Anexo I

Drifter ID: 31543
 Number of SST Observations: 2183
 Dates: 09-Jul-2012:19-Nov-2013
 Longitude: -44.003;-34.245
 Latitude: -11.953;-1.87



f

Drifter ID: 31546
 Number of SST Observations: 1285
 Dates: 09-Jul-2012:19-Nov-2013
 Longitude: -36.89;-34.327
 Latitude: -12.305;-4.818

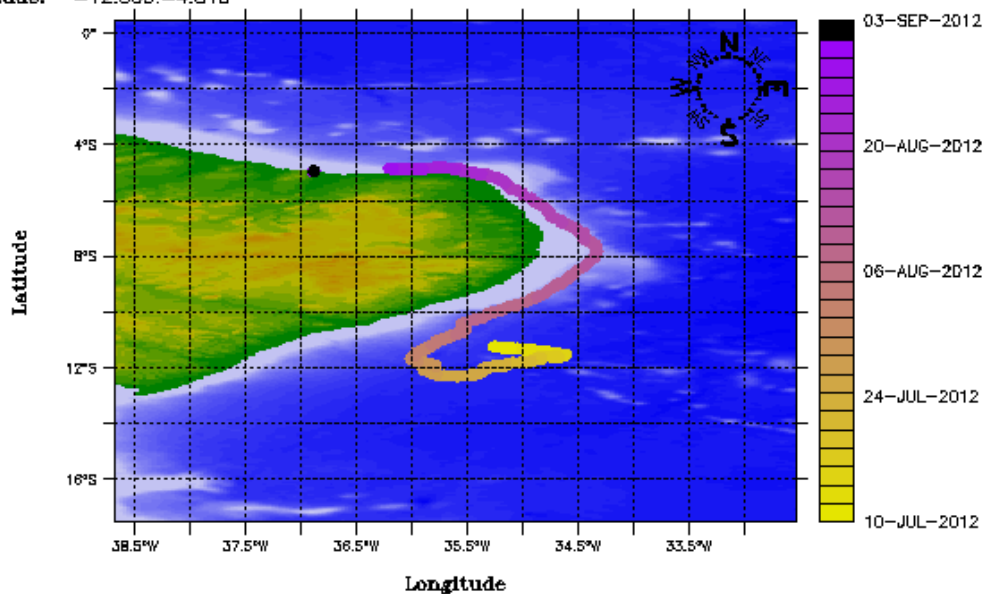


Figura A. Dados sobre a movimentação de derivadores ao longo da costa brasileira, referentes aos objetos 31543 (superior) e 31546 (inferior).

<Disponível em: http://www.aoml.noaa.gov/phod/dac/gdp_track.php>. Acesso em 24 de Dezembro de 2014.