



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**LAIS FERREIRA NOVAES**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO BIJUPIRÁ (*RACHYCENTRON CANADUM*)  
CULTIVADOS NA EMPRESA BAHIA PESCA POR MEIO DE MARCADORES  
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES**

**CRUZ DAS ALMAS - BA**

**2012**

LAIS FERREIRA NOVAES

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO BIJUPIRÁ (*RACHYCENTRON CANADUM*)  
CULTIVADOS NA EMPRESA BAHIA PESCA POR MEIO DE MARCADORES  
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à coordenação do Curso de  
Graduação em Engenharia de Pesca,  
da Universidade Federal do Recôncavo  
da Bahia, como requisito parcial para  
obtenção de grau de Bacharel em  
Engenharia de Pesca.

Orientador (a): Prof. Soraia Barreto A.  
Fonteles, D.Sc.

CRUZ DAS ALMAS - BA

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

N935 Novaes, Lais Ferreira  
Caracterização genética do bijupirá (*Rachycentron canadum*) cultivados na Empresa Bahia Pesca por meio de marcadores citogenéticos e moleculares / Lais Ferreira Novaes. Cruz das Almas, BA, 2012.  
47f.; il.

Orientadora: Soraia Barreto Aguiar Fonteles

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Genética 2. Bijupirá (peixe) 3. Marcadores Genéticos 4. Cromossomos 5. ISSR

I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título

CDD: 639.3

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB

LAIS FERREIRA NOVAES

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO BIJUPIRÁ (*RACHYCENTRON CANADUM*)  
CULTIVADOS NA EMPRESA BAHIA PESCA POR MEIO DE MARCADORES  
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Soraia Barreto Aguiar Fonteles, D.Sc.

Orientador (a)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

---

Prof. Maria Vanderly Andrea, D.Sc.

1º Membro

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

---

Prof. Ricardo Franco Cunha Moreira, D.Sc.

2º Membro

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

---

Prof. Marcelo Carneiro de Freitas, D.Sc.

Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

***À vida...***

***Jr, sobretudo, em frente!***

## AGRADECIMENTOS

Neste espaço deixo aqui meus agradecimentos a todos que contribuíram com a conclusão do meu trabalho.

Agradeço ao ser Supremo pelo ânimo cedido nos momentos difíceis que sempre me guiou no caminho certo.

A minha mãe, Dinamar, meu alicerce, motivo de inspiração, o ar que eu respiro, meus olhos quando não posso ver, meus ouvidos quando é difícil ouvir, meu exemplo de ser humano íntegro e honroso, onde eu reúno forças para seguir em frente.

Ao meu Pai, Rogério, que me ajudou enquanto foi possível e quando não pôde me tornou mais forte.

Ao meu anjo, Paulo César, por está ao meu lado tornando meus dias mais felizes, por ele não tenho palavras...

Aos familiares que me deram apoio e suporte quando foi preciso.

Aos amigos sempre presentes e que, mesmo quando distantes, transmitiram energias positivas, apoio nos momentos de tristeza e compartilhavam minhas alegrias.

Aos professores que conheci ao longo dos anos, principalmente aqueles do curso de Engenharia de Pesca, pela transmissão do conhecimento e ensinamentos que levarei por toda a vida, tentando sempre me tornar uma pessoa melhor.

Aos colegas de curso pela companhia e amizade.

Aos colegas do laboratório, principalmente Crislaine Moraes, Patrícia Reis, Wilma Brandão e Yslai Peixoto, que me ajudaram diretamente com a realização do meu trabalho.

A Carlos Eduardo Lopes e Emanuel Abreu pela contribuição nos resultados do trabalho.

A minha Orientadora Prof. Dra. Soraia Barreto de Aguiar Fonteles, por ter me recebido de braços abertos, disposta a ajudar no momento em que precisei de um espaço e por ter confiado e acreditado no meu potencial.

A Bahia Pesca, em especial Eduardo César Filho, José Jerônimo S. Filho, José Luiz S. Júnior e demais técnicos, pela colaboração ao ceder os peixes necessários para estudo.

## RESUMO

O *Rachycentron canadum*, mais conhecido pelo nome popular como “bijupirá”, é uma espécie de peixe proveniente de águas marinhas, encontrada em todos os oceanos e representa a família Rachycentridae, pertencente à Ordem Perciformes. É muito requisitado na aquicultura devido aos seus atributos zootécnicos, da mesma forma que é apreciado no mercado devido à qualidade da sua carne. Vinculado a esse contexto os estudos genéticos tem contribuído para aprofundar conhecimentos sobre a biologia de diversas espécies de peixes e tem proporcionado melhores rendimentos e manejo nas pisciculturas, a fim de aprimorar a produção. O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar geneticamente a espécie *R. canadum* por meio de marcadores genético-moleculares e citogenéticos. Através das informações geradas nesse trabalho por meio das preparações cromossômicas foi constatado um número modal de  $2n=48$  cromossomos. Por meio da técnica de ISSR ou SPAR-PCR foi verificada existência de baixa variabilidade genética dentre os indivíduos cultivados na Bahia Pesca, no qual os *primers* (AAGC)<sub>4</sub> e (TAGG)<sub>4</sub> foram considerados monomórficos, diferentemente do *primer* (GGAC)<sub>4</sub> onde foram observados alelos polimórficos.

**Palavras-chave:** Genética, bijupirá, peixes, cromossomos, ISSR.

## ABSTRACT

The *Rachycentron canadum*, better known by its popular name as "Bijupirá", is a species of fish from marine waters, found in all oceans. It is part of the family Rachycentridae and belongs to the order Perciformes. It is in high demand in aquaculture due to their zootechnical attributes, as that is reflected in the marketplace due to the quality of its meat. Genetic studies have contributed to deepen knowledge about the biology of various species of fish. They have also provided better yields and management on fish farms in order to improve production. This study aimed to characterize genetically the species *R. canadum* through genetic markers and molecular cytogenetics. Using the information generated in this work by means of chromosome preparations a modal number of  $2n = 48$  chromosomes was found. Through the technique ISSR or SPAR-PCR was verified existence of low genetic variability among individuals grown in Bahia Pesca, in which the primers (AAGC) 4 (Tagg) 4 were considered monomorphic, unlike primer (GGAC) 4 where polymorphic alleles were observed.

**Key words:** Genetic, cobia, fishes, chromosomes, ISSR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécie de estudo ( <i>Rachycentron canadum</i> ).....	6
Figura 2. Foto ilustrativa do bijupirá <i>R. canadum</i> .....	13
Figura 3. Bancada preparada para início do trabalho em citonegética.....	14
Figura 4. Metáfase obtida na preparação cromossômica para posterior formação do cariótipo ..	22
Figura 5. Cariótipo da espécie <i>Rachycentron canadum</i> .....	22
Figura 6. Ilustração dos produtos amplificados com o <i>Primer</i> (GGAC) <sub>4</sub> .....	24
Figura 7. Ilustração dos produtos amplificados com o <i>Primer</i> (TAGG) <sub>4</sub> .....	24
Figura 8. Ilustração dos produtos amplificados com o <i>Primer</i> (AAGC) <sub>4</sub> .....	25
Figura 9. Dendrograma obtido através da matriz genética no programa Genes.....	25
Tabela 1. Dados do programa utilizado na amplificação do DNA em PCR com os <i>primers</i> (AAGC) <sub>4</sub> e (GGAC) <sub>4</sub> ..	18
Tabela 2. Dados do programa utilizado na amplificação do DNA em PCR com o <i>primer</i> (TAGG) <sub>4</sub> ..	29
Tabela 3. Grupos formados no dendrograma de distância genética.....	25

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aquicultura Marinha.....	3
2.2 Biologia da Espécie.....	4
2.2.1 Ordem Perciformes.....	4
2.2.2 Família Rachycentridae e espécie <i>Rachycentron canadum</i> .....	5
2.3 Estudo genético de peixes.....	7
2.4 Análise citogenética e molecular.....	8
2.4.1 Análise citogénetica.....	8
2.4.2 Análise molecular.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Materiais.....	13
4.2 Métodos.....	14
4.2.1 Preparações cromossômicas.....	14
4.2.1.1 Técnica de estimulação mitótica.....	14
4.2.1.2 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	14
4.2.1.2.1 Protocolo proposto por Foresti <i>et al.</i> , (1993).....	15
4.2.1.2.2 Protocolo proposto por Gold <i>et al.</i> , (1990).....	15
4.2.1.3 Preparação das lâminas.....	16
4.2.1.4 Análise cromossômica e montagem do cariótipo.....	16

4.2.2 Extração de DNA.....	17
4.2.2.1 Quantificação de DNA.....	18
4.2.2.2 Amplificação do DNA via ISSR.....	18
4.2.2.3 Análise estatística do dados.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Citogenética.....	20
5.2 Genética Molecular.....	23
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXO A – SISTEMA OFFSHORE DE CULTIVO DO BIJUPIRÁ.....	34
ANEXO B – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA BAHIA PESCA, FAZENDA ORUABO, SANTO AMARO/BA. LOCAL ONDE FORAM REALIZADAS AS AMOSTRAGENS.....	34
ANEXO C – MATRIZ DOS DADOS GENÉTICOS GERADOS A PARTIR DO PROGRAMA GENES.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura, seja ela de espécies continentais ou marinhas, pode ser considerada, como a maior vertente de suprimento de proteína animal para a população mundial, visto que, outras áreas referentes ao agronegócio não possuem o mesmo ritmo e potencial de crescimento (FAO, 2010).

Os recursos pesqueiros estão se tornando cada vez mais escassos, devido à problemática de sobre-exploração das principais espécies comercialmente valorizadas no mercado mundial (anchovas, badejo do Alasca, arenque do Atlântico, atuns e etc). De acordo com Cavali & Ferreira (2010) a estagnação da pesca e o crescimento da demanda por pescados não deixam dúvidas que a produção de alimentos de origem marinha é insuficiente para atender as necessidades globais. Nesse contexto, o cultivo de organismos aquáticos tem se tornado um dos principais segmentos comerciais do mundo, e chegou a atingir no ano de 2009 um rendimento de 55,1 milhões de toneladas (FAO, 2010).

Dentre as espécies que mais apresentam potencialidade para a aquicultura marinha está o *Rachycentron canadum*, popularmente conhecido como “Bijupirá” em português, “Cobia” em inglês, “Bacalao” em espanhol e “Mafou” em francês (SHAFFER & NAKAMURA, 1989). Único representante da família Rachycentridae, pertencente ao grupo dos Perciformes, o *R. canadum* é uma espécie carnívora, pelágica, que vive na coluna d’água a uma profundidade de até 1.200m e tem vasta distribuição global, podendo ser encontrado nas regiões tropicais, subtropicais e áreas temperadas de águas quentes. Tem ocorrência em todos os oceanos, exceto na parte leste do Oceano Pacífico (SHAFFER & NAKAMURA, 1989).

São muitas as características que fazem do bijupirá um peixe promissor para a aquicultura marinha, dentre elas é possível citar sua aceitação às dietas artificiais (CRAIG *et al.*, 2006), fácil reprodução em sistema de cultivo (desova natural) (ARNOLD *et al.*, 2002), rápido crescimento e ganho de peso (SUN *et al.*, 2006), alto percentual de sobrevivência (CHOU *et al.*, 2000) e tolerância à salinidade das larvas ao cultivo (FAULK & HOLT, 2006). Essas características atreladas às ferramentas de estudos genéticos tendem multiplicar as vantagens referentes ao cultivo da espécie na aquicultura, para que esta seja ainda mais bem sucedida.

Para estudos utilizando abordagens genéticas em espécies de peixes neotropicais marinhas, selvagens e de cultivo, são utilizadas ferramentas, como citotaxonomia (ARTONI *et al.*, 2000), marcadores cromossômicos, morfogenéticos, moleculares e bioquímicos (MARTINS *et al.*, 2002), com objetivo de estudar populações naturais, assim como no manejo de estoques

em cultivo e analisar delineamentos de seleção para identificar parâmetros genéticos de interesse, respectivamente (WALMSLEY, 2004).

De acordo com Cipriano (2005), os estudos envolvendo genética de peixes nas regiões neotropicais teve início na década de 50 e somente mais tarde, no início da década de 70, pesquisadores brasileiros ingressaram na área. Também na década de 70 se formaram os primeiros grupos de pesquisas na área, hoje presentes em diversos Estados brasileiros, alguns já bem consolidados, a exemplo de São Paulo, e outros mais recentes em fase de consolidação (ARTONI *et al.*, 2000).

Conforme Artoni *et al.* 2000, numa forma geral todas as famílias de peixes neotropicais possuem espécies com algum tipo de informação acerca dos seus cromossomos, o que torna de grande relevância os dados obtidos até hoje, os quais contribuem para o conhecimento à respeito da evolução, biologia e sistemática desse importante grupo de vertebrados. Porém dentro da ictiofauna brasileira poucos peixes marinhos tem sido cariotipados e até o momento destacam-se estudados 120 espécies distribuídas em 43 famílias e 80 gêneros, que em sua maioria pertencem a Ordem Perciformes, contribuindo com 69 espécies (CIPRIANO, 2005), como *Centropomus paralellus* (NETO *et al.*, 2004), *Menticirrhus americanos* (ACCIOLY & MOLINA, 2008), *Ophioscion punctatissimus* e *Pareques acuminatus* (ACCIOLY & MOLINA, 2008).

Segundo Martins *et al.* (2002), a utilização de marcadores genéticos voltados aos peixes de cultivo geralmente associados a caracteres fenotípicos e marcadores enzimáticos ou bioquímicos, integrados a múltiplas formas moleculares de proteínas, representam abordagens iniciais que são usadas para analisar características que refletem a composição genética de estoques de peixes.

Entretanto, o uso de marcadores genéticos na aquicultura é bastante válido, pois contribui para aprimorar o desempenho de atributos favoráveis, como aumento das taxas de crescimento dos peixes e populações monossexo das espécies cultivadas, fornecendo dessa forma, maiores rendimentos no cultivo aos piscicultores, que poderão oferecer um produto de qualidade e de custos produtivos menores, o que favorece positivamente o mercado de maneira geral, a partir da qualidade oferecida no produto final. De acordo com Jacobina *et al.*, (2011), apesar da satisfatória tecnologia de reprodução disponível, existem poucas informações para conduzir iniciativas biotecnológicas e/ou melhoramento genético das espécies, especificamente no que diz respeito a aspectos citogenéticos.

Dessa forma, diante do exposto acima, se faz necessário aprofundar estudos genéticos que possam auxiliar em uma maior compreensão sobre as características biológicas das espécies e que isso passe a contribuir cada vez mais para o desenvolvimento do setor aquícola.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Aquicultura marinha**

A aquicultura é definida como o cultivo de organismos que passam todo seu ciclo de vida em ambientes aquáticos ou vivem pelo menos uma etapa da sua vida parcialmente dentro dele, com o objetivo de ser destinada à alimentação humana ou voltada para pesquisas científicas. O cultivo de animais aquáticos em sistemas controlados ou semi-controlados pelo homem é uma prática que teve início na China, há aproximadamente 4.000 anos, com o monocultivo da carpa (CAMARGO & POUHEY, 2005).

Segundo Sanches *et al.*, (2008) no que se refere ao cultivo de espécies marinhas, existem relatos que essa atividade teve início na Indonésia nos anos de 1400, mas somente a partir de 1960 a piscicultura marinha conseguiu destacar-se através dos avanços científicos no Japão. Ao introduzir novas técnicas de cultivo e manejo, a área pôde se expandir havendo o início da produção em grande escala.

A produção da aquicultura marinha mundial hoje é dominada pelos países asiáticos como, China, Japão, Indonésia, Tailândia, pois estes por não terem grandes espaços de terra, precisam voltar suas possibilidades de adquirir proteína animal para região costeira, garantindo dessa forma alimento de boa qualidade nutricional para grande demanda de sua população. Visto que essa área deixou de ser considerada como potencial para esses países, e se tornou uma atividade consolidada comercialmente.

Outras regiões, como a América do Sul tendo como exemplo o Brasil, atentaram para essa possibilidade num passado recente, e atualmente buscam dar início ao cultivo expressivo de espécies marinhas, principalmente aquelas que podem ser criadas em ambiente aquático natural, chamados sistemas *offshore* (anexo a). Foram registrados, 100 milhões de toneladas de produtos pesqueiros marinhos comercializados, sendo que 20,1 milhões foram provenientes da aquicultura (FAO, 2010). Dentro desse contexto, no ano de 2006 somente a China contribuiu com 7,3 milhões de toneladas com organismos marinhos, enquanto o Brasil,

nesse cenário produziu apenas 80.512 toneladas, e mesmo diante das circunstâncias, foi constatado um acréscimo de 3,2% na produção total da maricultura (IBAMA, 2006).

Embora as pesquisas tenham se intensificado nesta área na última década, a maricultura nunca existiu na prática como atividade comercial no Brasil (OSTRENSKY *et al.*, 2008). Diante da ampla possibilidade e potencialidade que o Brasil apresenta, voltada para a produção na aquicultura marinha, são claros os esforços e incentivo dados ao início da atividade através da iniciativa privada, instituições de pesquisa e governo.

Entretanto, a espécie estudada nesse trabalho apresenta, diante aos outros animais marinhos cultiváveis, características zootécnicas únicas que o torna ideal para a atividade. O bijupirá (*Rachycentron canadum*) possui atributos como rápido crescimento em cativeiro, chegando a atingir de 6 a 8 quilos em um ano, além de ter uma carne saborosa e de ótima qualidade nutricional. Seu cultivo é realizado basicamente em sistemas de gaiolas flutuantes em alto mar ou zonas costeiras mais profundas, logo que ainda não se têm condições tão boas nos sistemas tradicionais, como viveiros escavados ou até mesmo em tanques com recirculação de água, este ainda se torna inviável devido ao investimento inicial de alto custo.

De acordo com Sanches *et al.* (2008), o interesse de empresários despertaram ações políticas, fazendo com que a Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca da Presidência da República do Brasil (SEAP/PR), atual Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), avaliasse uma proposta de implantação, nas águas da União, do cultivo da espécie em questão, dando início dessa forma à produção do bijupirá em águas brasileiras.

## **2.2 Biologia da espécie**

### **2.2.1 Ordem Perciformes**

O Filo Chordata é o maior representante em números de espécies dentre todos os grandes grupos do Reino animal já descritos até hoje e nesse contexto encontra-se a Ordem Perciformes. Esta evidencia-se como a maior em diversidade entre as Ordens de peixes existentes e em meio aos vertebrados também, compreendendo 150 famílias e pelo menos 9.000 espécies descritas, sendo que 75% delas são marinhas e costeiras (CIPRIANO, 2005). Os animais pertencentes a este grupo podem ser encontrados em todos os ambientes aquáticos tanto de águas continentais, estuarinas e marinhas. E ainda inclui espécies de grande interesse comercial como o Atum (*Thunnus spp*) e Tainha (*Mugil platanus*).

Um grande número das espécies de Perciformes ocorre no segmento da região nerítica ou nos oceanos (FAHAY, 2007). Possuem mais da metade das espécies (337) de teleósteos demersais que ocorrem no Brasil, contendo aproximadamente 53% delas (HAIMOVICI & KLIPPEL, 1999).

Caracteriza-se pela presença de espinhos na nadadeira dorsal e anal, um espinho e até cinco raios na nadadeira pélvica, ausência de nadadeira adiposa, presença de 17 ou menos dos principais raios caudais disposto em até cinco espinhos sob a cauda, até 7 raios branquiostégios e 4 arcos branquiais (FAHAY, 2007).

Fahay (2007), afirma que as larvas apresentam muitos espinhos na cabeça, resultantes dos vários ossos no crânio, porém essa característica não está presente em todas as subordens. A morfologia das larvas dos peixes Perciformes, tem contribuído com a resolução de problemas associados com a filogenia dessa Ordem, embora estudos ontogenéticos sejam análises mais promissoras na área. Se a classificação presente aceita foi somente com base na morfologia larval, isso sugere que os avanços significativos das inter e intra relações dos Perciformes pode ser resultado a partir da maior compreensão de estudos ontogenéticos, ou seja, conhecer a origem e desenvolvimento das espécies desde o embrião até a sua forma de vida totalmente desenvolvida.

Conforme Accioly & Molina (2007), a Ordem Perciformes, devido ao seu tamanho e importância, vem acumulando um número crescente de estudos citogenéticos, porém apesar da maioria dos Perciformes ser de origem marinha, grande parte desse conhecimento está restrito a espécies dulcícolas.

### **2.2.2. Família Rachycentridae e espécie *Rachycentron canadum***

O bijupirá (Figura 1) é o único representante da família Rachycentridae e por isso a família apresenta as mesmas características que constituem a espécie.

Quanto à morfologia externa, o *Rachycentron canadum*, possui o corpo alongado, fusiforme e achatado. Podem atingir em um ano cerca de 36 cm e 400 g para fêmeas e 31cm e 300 g para os machos. Apresenta de 7-9 espinhos dorsais, 28-33 raios dorsais e nadadeira anal com a presença de 1-3 espinhos, 23-27 raios. Possuem de 11-14 vértebras, 13 ou 14 espinhos caudais, ausência de bexiga natatória, e presença da linha lateral bastante definida. A cor característica é marrom-escuro com uma faixa branca e preta lateral (SHAFFER & NAKAMURA, 1989).



Figura 1 – Juvenil de bijupirá (*Rachycentron canadum*) com 48,8 cm de comprimento

A espécie é encontrada numa ampla área global, nas regiões tropicais, subtropicais e em águas quentes das regiões temperadas, exceto ao leste do Oceano Pacífico. Especificamente, no Atlântico ocidental ela ocorre de Massachusetts e Bermudas até o Rio da Prata, na Argentina (BRIGGS, 1958; MENNI *et al.* 1984; NICHOLS and BREDER, 1926). No Atlântico oriental são vistos desde a costa do Marrocos à África do Sul (MONOD, 1973; SMITH, 1965). Está presente ao longo do Oceano Índico e no Pacífico oriental ocupa desde Hokkaido, no Japão, Austrália e leste da Índia (BIANCHI, 1985; FOURMANOIR, 1957; GRANT, 1972; HATCHELL, 1954; JORDAN and SEALE, 1906; LA MONTE, 1952; LINDBERG and KRASYUKOVA 1971; RELYEA, 1981; VENO, 1965).

Os fatores que definem a presença do bijupirá nesses pontos são as características físico-química e biológica da água, a exemplo da temperatura, que deve estar entre 18-32°C, salinidade, com variação de 22,5 à 44,5 ppm e alimento (tipos de organismos presente), como peixes e crustáceos (SHAFFER & NAKAMURA, 1989).

De acordo com Shaffer & Nakamura, (1989), no que diz respeito à reprodução, a espécie *Rachycentron canadum* não apresenta dimorfismo sexual externo. As fêmeas atingem a maturidade sexual com aproximadamente três anos de idade, diferente do macho, que já está apto a se reproduzir no seu segundo ano de vida. Para que suceda a reprodução, o macho corteja a fêmea, e então eles liberam o esperma e óvulos na água, respectivamente, onde dessa forma é realizada a fecundação externa.

É um peixe estritamente carnívoro, que se alimenta de crustáceos, alguns invertebrados bentônicos e peixes, quando adulto, e na sua fase juvenil alimenta-se de zooplâncton, tendo por preferência os copépodos. É bastante conhecido pelo seu rápido desenvolvimento, como taxa de crescimento e ganho de peso (SHAFFER & NAKAMURA, 1989).

Conforme Kenneth *et al.* (2007) pode ter um ganho em cerca de 197,5 g em dez dias quando cultivados. Na natureza, Shaffer & Nakamura, (1989), relatam que o bijupirá cresce rapidamente e possuem também um longo tempo de vida.

### 2.3 Estudos Genéticos

Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados (NELSON, 2006). Segundo Artoni & Martiello (2003), existem três razões que justificam a importância da genética como forma de conservação biológica. O primeiro fator, conforme o “Teorema Fundamental da Seleção Natural”, as mudanças evolutivas serão tão baixas quanto menor sejam a diversidade dentro de uma população, subtraindo portanto, suas chances de evolução. A segunda explicação é que a alta variabilidade genética intra-populacional está relacionada diretamente à adaptações, ou seja, a estagnação evolucionar. E o terceiro fator é que um organismo diplóide só pode apresentar dois genes alelos para um mesmo *locos* em cromossomos homólogos, mas numa população podem estar representados os diferentes alelos para um mesmo *locos*, o que determina toda a variabilidade genética nela existente.

Enquanto o ambiente natural está sendo degradado e populações de várias espécies estão ou superexploradas ou esgotadas, existe a necessidade de informação genética para elevar a gestão da conservação, de modo a proporcionar uma medida exata da biodiversidade (AFONSO & GALETTI, 2007). São diversas as razões, como a poluição, a sobre-pesca, introdução de espécies exóticas, construção de barragens em rios, cruzamento intraespecífico artificial, dentre outras, que tornam a diversidade genética e biológica enfraquecida ao longo dos anos.

A fim de proporcionar manobras atenuantes devido às consequências biológicas negativas, que interfiram no ciclo de vida das espécies de peixes dentro do seu habitat natural, a genética aplicada se tornou uma aliada primordial para a preservação e manejo desses organismos no ambiente aquático. Com isso diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas

em estudos de diversidade genética e biologia da conservação (MATSUMOTO & HILSDORF, 2009), do mesmo modo que também são empregadas técnicas de manipulação cromossômica.

Conforme Artoni & Martiello (2003), aspectos da conservação genética permitem analisar a estrutura de comunidades, sua ecologia evolutiva e, desta forma, fornecer subsídios para recomendar o manejo, e conseqüentemente, manter a variabilidade genética. Como também, um dos principais objetivos no que diz respeito ao uso de marcadores genéticos na piscicultura é determinar se as amostras do cultivo ou as populações naturais são diferenciadas geneticamente uma das outras.

As duas principais vertentes envolvidas na área da ictiogenética, estudo de populações e marcadores aplicados à aquicultura, estão cada vez mais eficientes graças a estudos mais aprofundados diante das diversas espécies existentes, apesar da grande quantidade de espécies que ainda não foram analisadas.

## **2.4 Análise citogenética e molecular**

### **2.4.1 Análise citogenética**

Citogenética é a ciência que realiza o estudo dos cromossomos. Até o final dos anos 70 pouco existia o conhecimento a respeito de estudos citogenéticos da ictiofauna neotropical, até que nos últimos anos houve um grande desenvolvimento da área focando essas espécies (PERES, 2005). Esse desenvolvimento tem permitido uma maior contribuição da citogenética não só com análises filogenéticas e taxonômicas, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica e relações evolutivas entre as espécies. Com destaque para ordem dos vertebrados Perciformes envolvida em distintas teorias quanto a sua origem e comportamento genético estrutural ao longo dos anos.

Os peixes apresentam ampla variação cariotípica, possuindo um número de cromossomos diplóides que variam de  $2n=12$  a  $2n=250$ , além de polimorfismos intrapopulacionais e intraespecíficos, característica explicada pelo fato dos peixes representarem um grupo de animais primitivo muito heterogêneo que foi submetido a processos evolutivos em diferentes direções (KIRPICHNIKOV, 1981).

No estudo citogenético, as espécies são caracterizadas quanto ao número e morfologia cromossômica e, a partir desses dados, técnicas de bandeamentos cromossômicos são aplicadas visando conhecer a estrutura e organização molecular dos cromossomos, bem

como mapear genes específicos. Análises cromossômicas comparativas são realizadas em diferentes níveis taxonômicos (famílias, gêneros e espécies), as quais contribuem para o entendimento da evolução e filogenia cromossômica dos grupos. Além disso, através dos dados citogenéticos de peixes se torna possível o conhecimento citotaxonômico, principalmente no estudo de complexo de espécies, identificação de espécies novas e até mesmo espécies crípticas (disponível em <<http://www.nupelia.uem.br>>).

Através desses estudos, marcadores cromossômicos têm sido utilizados com grande sucesso em estudos de populações naturais, assim como o manejo de estoques em cultivo, cujos objetivos tem sido aumentar a produção de novas linhagens e o desenvolvimento de tecnologias modernas, incluindo manipulação sexual e cromossômica, a criopreservação de gametas, a obtenção de indivíduos transgênicos e o mapeamento genômico (MARTINS *et al.*, 2002).

Incluído nesse segmento e com ênfase na aquicultura é possível citar como exemplo a tecnologia de hibridação, um procedimento que tem sido bastante utilizado dentre as metodologias clássicas de manipulação genética, devido às suas facilidades de manejo e execução prática, que permite o atendimento da demanda de mercado para produtos diferenciados, voltado ao consumo alimentar, pesca esportiva ou cultivo de peixes (SOUZA *et al.*, 2009). De acordo com Martins *et al.* (2002), nos projetos de hibridação o conhecimento dos níveis de ploidia dos produtos derivados dos cruzamentos interespecíficos, que podem resultar em indivíduos ginogenéticos, androgenéticos, triploídes, tetraploídes, híbridos diplóides e a identificação de bancos genéticos é obtida através dos estudos cromossômicos, que se tornam de fundamental importância na caracterização de espécies crípticas e raças cromossômicas, prevenindo também, cruzamentos não desejados na piscicultura em virtude do possível controle na manipulação dos híbridos.

Contudo a ampliação no entendimento dos processos que envolvem o fenômeno de hibridação podem auxiliar em programas de conservação dos recursos pesqueiros, e nos projetos a serem desenvolvidos na aquicultura (SOUZA *et al.*, 2009), assim como a utilização de marcadores citogenéticos, da mesma forma que outras metodologias de bandejamento cromossômico, podem ser bem significativos nos programas de melhoramento genético em peixes, manipulação cromossômica, simples marcadores aplicados à piscicultura (MARTINS *et al.*, 2002) e mapeamento geográfico de populações, relações intra e interespecíficas e o comportamento evolutivo característico para as famílias e espécies de peixes.

### 2.4.2 Análise molecular

A utilização de marcadores moleculares, em decorrência do desenvolvimento de novos procedimentos na biologia molecular, tem se transformado em ferramenta importante para o conhecimento e avaliação genética de populações de peixes selvagens e em cativeiro, no qual podem ser aplicadas para: observar a variabilidade, parentesco, estrutura populacional, identificar espécies, híbridos e linhagens, variação genética entre populações selvagens e cultivadas, impacto genético ao introduzir peixes provenientes de cultivo em ambientes com populações naturais, localização de marcadores ligados a genes relacionados com caracteres de interesse econômico, dentre outros (HILSDORF & KRIEGER, 1998).

Atrelado a este fato, nos últimos 20 anos o uso dos marcadores microssatélites se tornou frequente em estudos ictiológicos, devido as suas vantagens em relação ao uso de minissatélites, que caracteriza-se pelo alto grau de polimorfismos e serem passíveis de análise via PCR. Sunnucks (2000), afirma que marcadores moleculares são simplesmente caracteres diferenciáveis herdados por um indivíduo de uma certa população de acordo com a sequência de DNA. Este pode ser extraído através de qualquer tecido fixado por tempo indeterminado e essa vantagem permite visualizar variações ocorridas no perfil genético de cada indivíduo.

Diante das diversas técnicas utilizadas como marcadores de DNA, uma variação do uso de microssatélite é o método SPAR-PCR ou ISSRs (*Inter Simple Sequences Repeats*). Conforme Gupta *et al.* (1994) esta é uma forma simples e rápida de revelar marcadores de DNA que ocorrem repetidamente em séries de di, tri, tetra e penta nucleotídeos onipresentes em genomas dos seres vivos eucariontes. Atua em conjunto via amplificação, pela PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), de fragmentos de DNA flanqueados por microssatélites. Com isso, detecta a variação do número de repetições encontradas dentro de uma sequência (*motif*), revelando polimorfismos em pares de bases simples, o que torna a técnica bem sucedida para aplicação na distinção dos indivíduos pertencentes às espécies de vertebrados. (GUPTA *et al.*, 1994).

Perante a versatilidade da técnica permitir-se ser aplicada tanto em plantas quanto em animais, os *primers* SPAR têm revelado ser eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos e interespecíficos, uma vez que amplificam regiões entre dois blocos de microssatélite (MARTIN, *et al.*, 2009). O DNA é reconhecido em três classes de sequências repetitivas determinadas pelo comprimento das unidades que o forma, e dentre estes existem o DNA satélite, no qual sua unidade de repetição é formada por centenas até

milhares de nucleotídeos; o DNA minissatélite composto por blocos de 10 à 64 pares de bases de nucleotídeos; e finalmente o DNA microsatélite, que é constituído de sequências com apenas 6 pares de bases (LUCIO, *et al.*, 2001).

A técnica apresenta vantagens quando comparada ao emprego tradicional de microsatélites, pois são utilizados primers arbitrários que reconhecem qualquer genoma de interesse. Conforme Möller & Pinheiro (2009), os microsatélites estão dispersos em todo o genoma, apresentam facilidade em serem acessados, são multialélicos, co-dominantes e possibilidade para serem automatizados. Porém a desvantagem desse método é ter um custo elevado de implantação (MOLLER & PINHEIRO, 2009) e sua aplicação inicial seria prejudicada, o que torna lento começo das pesquisas relacionadas à melhoria genética dos organismos aquáticos de interesse comercial, a exemplo do bijupirá.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é caracterizar geneticamente o bijupirá (*Rachycentron canadum*), por meio de marcadores citogenéticos e moleculares, visando o conhecimento da variabilidade genética dos estoques cultivados na Fazenda Oruabo, bem como ampliar os conhecimentos genéticos relacionados à biologia da espécie atrelados a estudos com fins voltados para aquicultura.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Formação de banco de dados em forma de DNA preservado;
- Caracterizar o *Rachycentron canadum* através de marcadores citogenéticos;
- Caracterizar o *Rachycentron canadum* através de marcadores moleculares ISSR;
- Fornecer informações genéticas aplicáveis na melhoria do cultivo do bijupirá, (*Rachycentron canadum*).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material

As análises citogenéticas e moleculares foram realizadas com a espécie marinha *Rachycentron canadum* (Figura 2).



Fonte: [http://foros.pesca.org.mx/uploads/esmedregal\\_o\\_cobia\\_1821.jpg](http://foros.pesca.org.mx/uploads/esmedregal_o_cobia_1821.jpg)

Figura 2 - Ilustração do bijupirá

Filo Chordata

Classe Actinopterygii

Subclasse Neopterygii

Infraclasse Teleostei

Superordem Acanthopterygii

Ordem Perciformes

Subordem Percoidei

Família Rachycentridae

Gênero *Rachycentron*

Espécie ***R. canadum***

(LINNAEUS, 1776)

O experimento foi realizado durante o período entre Agosto de 2011 à Novembro de 2012, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA localizado na Universidade Federal de Recôncavo da Bahia – UFRB, campus Cruz das Almas. Foram coletados 33 exemplares adquiridos no laboratório experimental da Bahia Pesca na Fazenda Oruabo, localizada em Acupe (região do Recôncavo da Bahia), município de Santo Amaro/BA (anexo b), em cinco viagens destinadas às coletas. Os animais foram transportados vivos para o laboratório de Ictiogenética – UFRB em sacos plásticos e em tanques de polietileno de 1000 L com auxílio de bombas de oxigênio e devidamente aerados. Ao chegarem, foram mantidos em tanques com água salina de aproximadamente 22 ppm e aeração constante até utilização.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparações cromossômicas

#### 4.2.1.1 Técnica de estimulação mitótica.

A obtenção dos cromossomos mitóticos utilizando solução de leveduras antecedeu a preparação cromossômica. Essa técnica tem sido realizada com sucesso em peixes e consiste em aumentar o processo de divisão celular através da inoculação de leveduras. Dessa maneira o procedimento ocorreu da seguinte forma:

- a) Preparar a solução composta por 0,5g de fermento biológico seco, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada. Incubar a 40°C durante 15 minutos.
- b) Injetar 1 ml para cada 100 g de peso corporal do peixe da solução, de forma intramuscular, na região dorsal no animal e mantê-los, previamente identificados, nos tanques num período de 24 a 48 horas antecedendo as etapas posteriores.

#### 4.2.1.2 Obtenção de cromossomos mitóticos.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da comparação de dois protocolos já descritos na literatura proposto por Foresti *et al.* (1993) e Gold *et al.* (1990) com adaptação. A Figura 3 apresenta a bancada organizada para a preparação citogenética contendo todos os materiais necessários à obtenção das figuras mitóticas.



Figura 3 - Bancada preparada para início do trabalho de citogenética.

**4.2.1.2.1 Protocolo proposto por Foresti *et al.* (1993):**

- a) Retirar partes do rim cefálico e/ou anterior do animal;
- b) Colocá-lo no meio de cultura da solução de Hank's e dissociá-lo com auxílio de duas pinças de ponta fina em temperatura ambiente;
- c) Dissociá-lo com ajuda de uma seringa de vidro sem agulha, aspirar e eliminar o material aproximadamente 10 vezes;
- d) Transferir o material para o tubo de centrífuga milimetrado, e acrescentar 2 gotas de colchicina 0.02 % (empregada para desfazer as fibras do fuso na mitose e impedir a anáfase), ressuspendendo-o 10 vezes lentamente com pipeta de Pauster, numa quantidade total de 6 ml do conteúdo e caso não atinja, deve ser completado com Hank's;
- e) Encaminhar o material para estufa a 37°C por 15 minutos e em seguida centrifugar por 10 minutos a 1.200 rpm;
- f) Retirar o sobrenadante e acrescentar 6 ml de KCl (solução hipotônica), ressuspender o material por 20 vezes suavemente e pôr novamente na estufa à 37°C por um tempo de 28 minutos;
- g) Preparar fixador (45ml de metanol gelado/15ml de ácido acético, sempre numa proporção 3:1), aplicar 10 gotas ao sair da estufa, ressuspender 30 vezes e deixar descansar durante 5 minutos em temperatura ambiente;
- h) Adicionar mais 6 ml de fixador, ressuspender o material 50 vezes e centrifugar por 10 minutos a 1.200 rpm;
- i) Retirar o sobrenadante, pôr 6 ml de fixador, ressuspender o material com força 100 vezes e centrifugar por 6 minutos na mesma rotação. Repetir esta etapa três vezes;
- j) Acertar a concentração adicionando 2 ml de fixador, até que a suspensão de células não esteja muito turva e manter sob refrigeração no congelador ou freezer.

**4.2.1.2.2 Protocolo proposto por Gold *et al.* (1990):**

- a) Retirar partes do rim cefálico e/ou anterior do animal;
- b) Colocar o material em 6 ml de meio de cultura RPMI 1640;
- c) Dissociar o material com duas pinças de ponta fina e seringa de vidro sem agulha aspirando-o e eliminando-o cuidadosamente;
- d) Transferi-lo para um tubo milimetrado completando o volume final de 9 ml do meio de cultura;

- e) Adicionar 5 gotas de colchicina 0,025 % e homogeneizar o material com pipeta de Pasteur deixando-a agir por 30 minutos em temperatura ambiente;
- f) Centrifugar por 10 minutos a velocidade de 900 rpm;
- g) Retirar o sobrenadante e acrescentar 9 ml de KCl (solução hipotônica), ressuspender o material e deixar agir por 25 minutos à temperatura ambiente;
- h) Em seguida acrescentar 5 gotas de fixador (45 ml de metanol:15 ml de ácido acético sempre numa proporção de 3:1);
- i) Centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm, ao fim do tempo descartar o sobrenadante, acrescentar 6 ml de fixador e centrifugar (repetir esta etapa por três vezes);
- j) Acertar a concentração do material com 1 - 1,5 ml de fixador ou até que se obtenha uma suspensão de células não muito turva.

Neste protocolo foram feitas adaptações nos itens (b), no qual foi utilizado o meio de cultura Hank's e no item (e), em que a colchicina 0,025 % foi substituída pela colchicina 0,02 %.

#### **4.2.1.3 Preparação das lâminas.**

As lâminas devem estar mergulhadas em álcool, no momento do uso secá-las com tecido macio e identificá-las de acordo com o material a ser utilizado. Gotejar de uma a duas gotas da suspensão de células na lâmina, previamente calçadas num suporte em banho-maria aquecido à 60°C, retirar rapidamente, para que os cromossomos não sejam “queimados” e deixar secar naturalmente. Por fim corar com solução convencional de Giemsa (tampão fostato/giemsa 30:1) durante 25 minutos. Lavar com água destilada e deixar secar.

#### **4.2.1.4 Análise cromossômica e montagem do cariótipo.**

Posterior ao seu preparo, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio binocular Olympus BX 60 em ocular 10x/objetiva 40x e sistema de imagem acoplada a uma câmera de alta definição, para identificar seu número diplóide e análise de tamanho dos cromossomos. Para montagem do cariótipo os cromossomos foram pareados em ordem decrescente de tamanho e classificados quanto a sua morfologia em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a), de acordo com a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964).

#### 4.2.2 Extração de DNA.

O DNA da espécie foi extraído segundo o protocolo já descrito por Sambroock *et al.* (1989) e detalhado subsequentemente:

- a) Pôr pedaços dos tecidos, anteriormente fixados em álcool absoluto ou 94%, em tubos tipos eppendorf e macerá-los ou picá-los (exceto sangue) e deixar em estufa a 37°C para retirar o excesso de álcool da fixação;
- b) Adicionar tampão de extração aos tubos: 4  $\mu$ l de Tris- Cl 1M pH 8,0 + 160  $\mu$ l de EDTA 0,25M pH 8,0 + 20  $\mu$ l de SDS 10% + 216  $\mu$ l de água destilada;
- c) Acrescentar RNase (opcional);
- d) Deixar em estufa a 37°C durante 1 hora e posteriormente adicionar 2 – 3  $\mu$ l de Proteinase K e colocar em banho-maria a 37°C, onde deve permanecer entre 24 à 72 horas (de acordo com o tecido usado) até que esteja bem dissolvido;
- e) Após esse tempo, pôr um volume de Fenol correspondente a 400  $\mu$ l, agitar durante 15 minutos e em seguida centrifugar a 6.000 rpm durante 5 minutos;
- f) Retirar 350  $\mu$ l do sobrenadante e preservá-lo em outro tubo eppendorf;
- g) Adicionar um volume de Fenol correspondente a 350  $\mu$ l, agitar por 15 minutos e centrifugar por 5 minutos a 6.000 rpm;
- h) Retirar 300  $\mu$ l do sobrenadante e preservá-lo novamente em outro tubo eppendorf;
- i) Adicionar 300  $\mu$ l de Álcool isoamílico-clorofórmio (1:24), agitar durante 15 minutos e centrifugar durante 10 minutos a 6.000 rpm;
- j) Retirar e conservar 250  $\mu$ l do sobrenadante e colocar em outro tubo eppendorf, adicionando 10% do volume final de NaCl e agitar levemente;
- k) Por Etanol absoluto gelado num volume correspondente a 2,5 x do total que ficou no tubo e agitar cuidadosamente, verificando se há formação da nuvem de DNA;
- l) Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos;
- m) Retirar o álcool absoluto com cuidado para que não descarte o *pellet* de DNA;
- n) Adicionar aproximadamente 1 ml de álcool 70 %, pôr na centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos novamente, para lavagem do material;
- o) Retirar o álcool e posicionar os tubinhos num suporte deitados ou inclinados para secar *over night*;

- p) No dia seguinte diluir em 100  $\mu$ l de solução tampão TE 1M pH 8,0 e deixar em banho-maria 37°C num período de 48 horas;
- q) Passado esse tempo, estocar o material sob refrigeração à -20°C.

#### 4.2.2.1. Quantificação de DNA.

A qualidade e quantidade do DNA extraído foi realizada através do sistema gel de agarose (1%) por eletroforese com brometo de etídio (1,5 $\mu$ l) e corante marcador, azul de bromofenol (3  $\mu$ l). O gel foi posto numa cuba eletrolítica sob 70 Volts e amperagem de 500 durante 45 minutos. Decorrente a corrida, a foto do gel foi registrada no transluminador UV, através do sistema de foto-documentação L-PIX Loccus Biotecnologia - Molecular Imaging. A concentração de DNA foi estimada visualmente e quantificada no programa Excel com dados fixos e valores (ng/ $\mu$ l) que se ajustavam mediante a quantificação visual.

#### 4.2.2.2. Amplificação do DNA via ISSR

Quatro iniciadores de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), (AAGC)<sub>4</sub>, (TAGG)<sub>4</sub>, (GGAC)<sub>4</sub> e (GACA)<sub>4</sub> foram testados e três demonstraram boa resolução os quais foram selecionados para análises posteriores. Exceto (GACA)<sub>4</sub>, que não foi informativo para as análises com o *R. canadum*. A amplificação do DNA foi realizada a partir da utilização do aparelho termociclador Applied Biosystems, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), programado de acordo à ilustração da Tabela 1 e 2. O mix de PCR (25  $\mu$ L) para análise de ISSR foi composto por: 20 ng de DNA genômico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,3  $\mu$ M do iniciador e 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após a PCR as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2%, tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio. O "ladder" de 100 pb (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) foi utilizado como padrão molecular para tamanhos de bandas. A eletroforese foi realizada a 50V por 3 horas. Após a corrida, os géis foram visualizados e gravados em equipamento L-PIX Loccus Biotecnologia - Molecular Imaging.

#### 4.2.2.3 Análise estatística dos dados

As bandas de ISSR reprodutíveis foram avaliadas como ausentes (0) ou presentes (1) para cada um dos indivíduos analisados. O loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais presente não era superior a 0,99. As diferenças qualitativas na intensidade das bandas não foram consideradas. Para as análises moleculares foi calculada a

distância de Jaccard. Os agrupamentos hierárquicos das análises a partir das matrizes de distância genética foram obtidos pelo método de UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (SNEATH & SOKAL, 1973). Foram utilizados o programa GENES (CRUZ, 2008) e STATISTICA (STATSOFT, 2005).

Tabela 1. Programa de amplificação do DNA para o *primer* (AAGC)<sub>4</sub> e (GGAC)<sub>4</sub>.

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	1 minuto	39
Anelamento	50 °C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	1
Resfriamento	14°C	Indeterminado	--

Tabela 2. Programa de amplificação do DNA para o *primer* (TAGG)<sub>4</sub>.

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	45 segundos	35
Anelamento	50 °C	30 segundos	
Extensão	72°C	1 minuto e meio	1
Resfriamento	4°C	Indeterminado	--

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Citogenética

A análise a partir da suspensão de células possibilitou estudar os cromossomos da espécie *Rachycentron canadum*, na qual apresentou um valor modal diplóide com 48 cromossomos (Figura 4), divididos em um par submetacêntricos, dois pares subteloentrícos e 21 pares acrocêntricos (Figura 5). Este resultado corrobora com o estudo realizado por Jacobina *et al.* (2011) para a mesma espécie, proveniente de cultivo em Natal no estado do Rio Grande do Norte.

A composição cariotípica formada por 48 cromossomos reafirma a condição primitiva basal de preservação gênica para maioria dos Perciformes, grupo o qual pertence o *R. canadum*. Apesar desta Ordem possuir a maior diversidade dentre as espécies dos vertebrados, pressupõem-se que o grupo apresentaria uma diferenciação cariotípica significativa em meio às outras famílias e espécies de peixes que a compõe, porém a sua conservação cromossômica, conhecida como estase, é evidenciada em diversos estudos genéticos de peixes, o que estabelece uma condição plesiomórfica na estrutura do grupo, a exemplo das espécies anteriormente analisadas: *Pomadasys corvinaeformis* e *Anisotremus virginicus* (ACCIOLY & MOLINA, 2007), *Strongylura timucu* e *S. marina* (CIPRIANO, 2005), *Conodon nobilis* (MOTTA NETO, 2010).

Segundo Galetti Jr. *et al.* (2000), embora exista uma variação no número de cromossomos, presente na maioria dos peixes marinhos, o grupo Perciformes, apresenta pouca divergência cromossômica e um cariótipo formado por  $2n=48$  acrocêntricos. Ou seja, para grande maioria, não há nenhuma forma de rearranjo robertsoniano (fusões), deleção ou heteromorfismo sexual cromossômico.

Tal condição é frequente aos peixes marinhos e difere nos peixes de água doce, até mesmo dentre aqueles pertencentes à mesma ordem, que apresentam maior diversidade tanto no seu número cromossômico, quanto na uniformidade cariotípica (CIPRIANO, 2005), e está associada segundo Accyoly (2007), ao alto poder dispersivo das larvas pelágicas em função das correntes marinhas, proporcionando e permitindo a manutenção de conexões entre populações situadas em regiões distantes entre si, na qual interfere diretamente na distribuição das espécies, reduz o polimorfismo e mantém o padrão genético, o que possibilita a manutenção das estruturas cariotípicas, tornando-as resistentes às diversificações evolutivas.

Para Galetti Jr. *et al.* (2006) o comportamento das famílias inseridas nos Perciformes consiste num conjunto de fatores associados à inexistência de barreiras geográficas bem definidas, intenso fluxo gênico devido a habilidade de dispersão dos indivíduos e a ocorrência de grandes populações presentes no ambiente marinho.

Diante de tamanha diversidade fenotípica, abrangendo morfologia, morfometria e anatomia a qual possuem os Perciformes, definitivamente essas características não estão associadas às composição do seu cariótipo. De acordo com Accioly & Molina (2007) este fato se torna interessante, pois estudos sugerem que este grupo não tenha uma origem monofilética, contrastando com padrão basal de cariótipos encontrados nas demais espécies deste táxon. Em contrapartida, Brum, (1995) tem afirmações divergentes quanto à origem dos teleósteos modernos e defende a teoria em que o grupo ancestral do qual se originaram possuía o cariótipo composto por 60 cromossomos acrocêntricos, mas em virtude de rearranjos cromossômicos modificaram sua estrutura em metacêntricos e subtelocêntricos. Essa reorganização se torna possível devido ao processo de fusão entre dois cromossomos acrocêntricos em um único cromossomo ou processo contrário, onde ocorre uma fissão.

Com intuito de aprofundar e esclarecer o entendimento sobre as relações interespecíficas de peixes marinhos também podem ser utilizadas características morfológicas para inferir esses dados. Johnson (1984) e Freihof, (1978 *apud* JOHNSON 1984) reuniram as famílias Nematistiidae, Rachycentridae, Coryphaenidae, Echeneidae e Carangidae e constituíram-nas num grupo monofilético (carangóides) em função de apresentarem sinapomorfias envolvendo uma aparente especialização do sistema lateral no canal nasal, pequenas aderências de escamas ciclóides e expansão lamelar ao longo da margem anterior do coracóide.

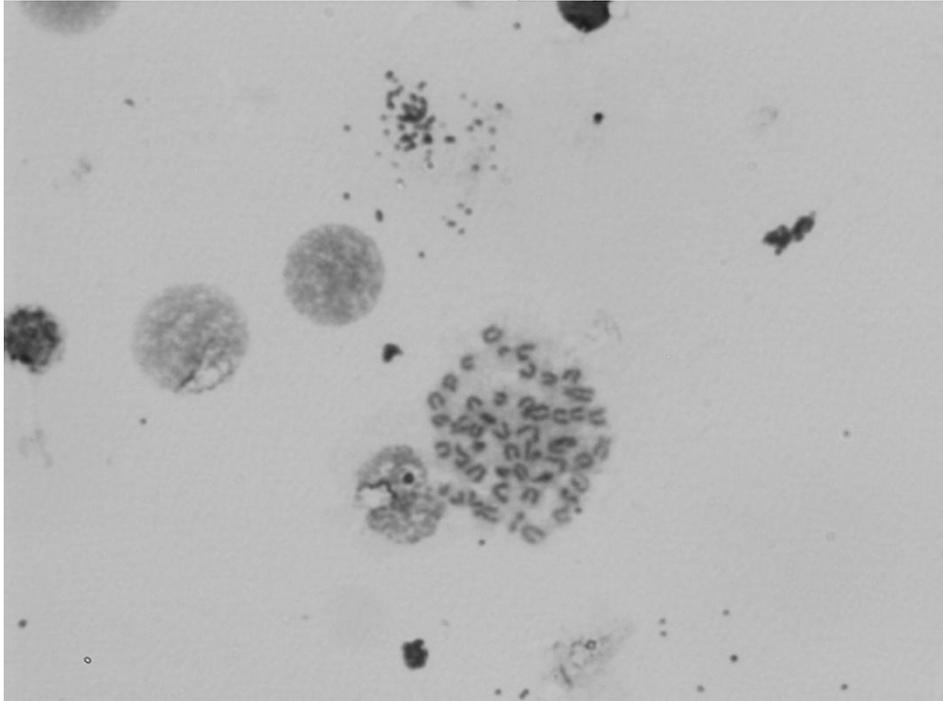


Figura 4 - Metáfase do *Rachycentron canadum* com coloração convencional de Giemsa.



Figura 5 - Cariótipo da espécie *Rachycentron canadum*, evidenciando um único par de cromossomos submetacêntrico (SM), dois pares de cromossomos subtelocêntricos (st) e 21 pares de cromossomos acrocêntricos (a).

## 5.2 Genética Molecular

Através de uma planilha de quantificação, o DNA foi avaliado visualmente em comparação ao marcador Lambda, que apresentou em média 17,16 ng/ $\mu$ l para as 15 amostras de DNA extraídos com boa qualidade visual, o que possibilitou as consecutivas etapas do trabalho. Para obtenção dos padrões amplificados de DNA foram realizados testes preliminares com quatro *primers* de repetição tetranucleotídica, (AAGC)<sub>4</sub>, (TAGG)<sub>4</sub>, (GGAC)<sub>4</sub> e (GACA)<sub>4</sub>, mas apenas três forneceram resultados informativos: (AAGC)<sub>4</sub>, (TAGG)<sub>4</sub>, (GGAC)<sub>4</sub>.

Os padrões espécie-específicos obtidos para a espécie *Rachycentron canadum* foram estimados visualmente através da comparação com o marcador de massa molecular Ladder 100 pb, com 14 fragmentos que alternavam entre 2072, 1500, 600 e 100 pb. Com o *primer* (GGAC)<sub>4</sub>, a espécie *R. canadum* apresentou a formação de cinco alelos com pesos moleculares de aproximadamente 1100, 800, 765, 600 e 550 pb (Figura 6). Já o *primer* (TAGG)<sub>4</sub> apresentou somente dois alelos com pesos moleculares próximos a 1500 e 1000 pb (Figura 7). Para o *primer* (AAGC)<sub>4</sub>, foram constatados sete alelos com pesos moleculares de 1170, 1000, 865, 735, 600, 425 e 350 pb aproximadamente (Figura 8). Dessa forma três marcadores espécie-específicos se tornaram passíveis de caracterização da espécie.

O *primer* (GGAC)<sub>4</sub>, além de ser evidenciado como bom marcador espécie-específico, constatado também por Bignotto *et al.* (2009) na caracterização de peixes Siluriformes, apresentou variações para alguns indivíduos nas bandas de menor peso molecular 600 e 500 pb, enquanto dois indivíduos (6 e 8) tiveram resultados diferenciados mais expressivos, apresentando somente uma banda com o maior peso molecular de 1100 pb. Mesmo com baixo grau de polimorfismo, ainda assim, este foi o padrão que demonstrou maior diferenciação entre os alelos, quando comparado aos outros *primers*. Este resultado corrobora com o estudo realizado por Guedes *et al.* (2008), no qual foi constatado um elevado polimorfismo entre os indivíduos analisados através do mesmo marcador, apresentando até 96% de polimorfismo.

Para o *primer* (TAGG)<sub>4</sub> dois indivíduos (1 e 2) não apresentaram as únicas bandas que foram padrões para o marcador, todavia não foi evidenciado polimorfismo entre os indivíduos amostrados. Com o *primer* (AAGC)<sub>4</sub> o resultado também não exibiu variação nas bandas, constituindo-se onipresente para todos os indivíduos. O comportamento de *loci* monomórficos presente nesta população amostrada indica a baixa variabilidade genética entre os indivíduos, o que os tornam a curto prazo, mais vulneráveis a mortalidade por enfermidades

ou a longo prazo o surgimento de defeitos morfogenéticos. A presença de *loci* monomórficos nos três marcadores utilizados corroborou e foi evidenciada pelos resultados obtidos por meio da análise estatística, resultante da matriz de distância genética gerada pelo programa Genes (anexo c) e o dendrograma (Figura 9).

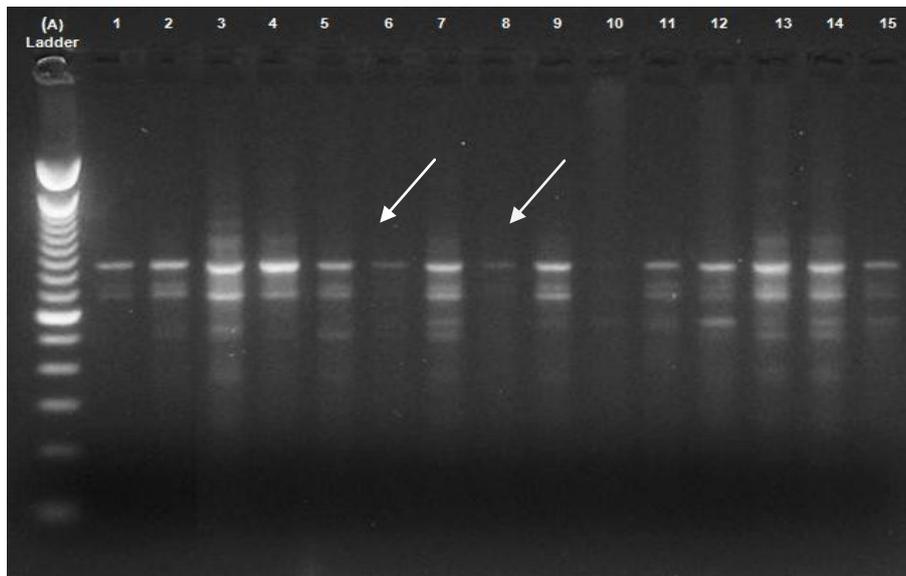


Figura 6 – Amplificação do DNA pela PCR utilizado o *primer* (GGAC)<sub>4</sub>. A= Ladder de 100 pb. (Reação em Cadeia de Polimerase).

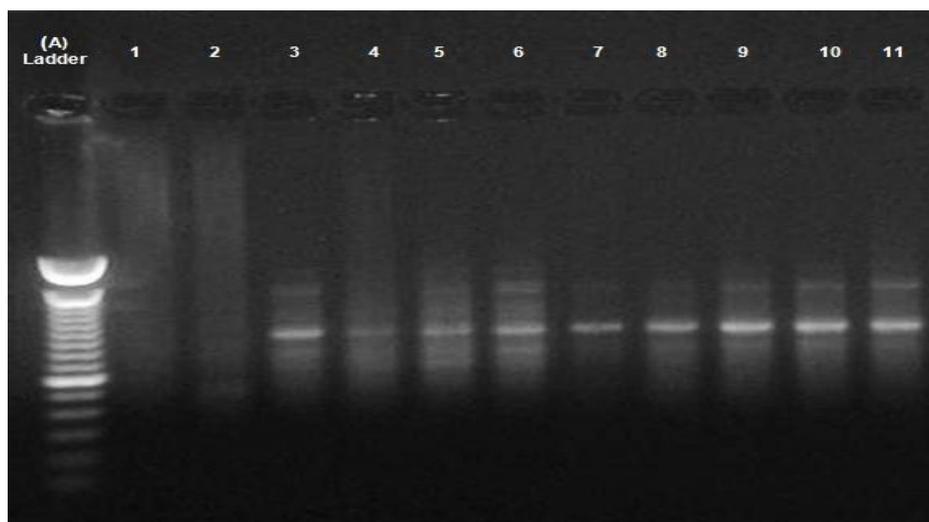


Figura 7 – Amplificação do DNA pela PCR utilizando *primer* (TAGG)<sub>4</sub>. A= Ladder de 100 pb. (Reação em Cadeia de Polimerase).

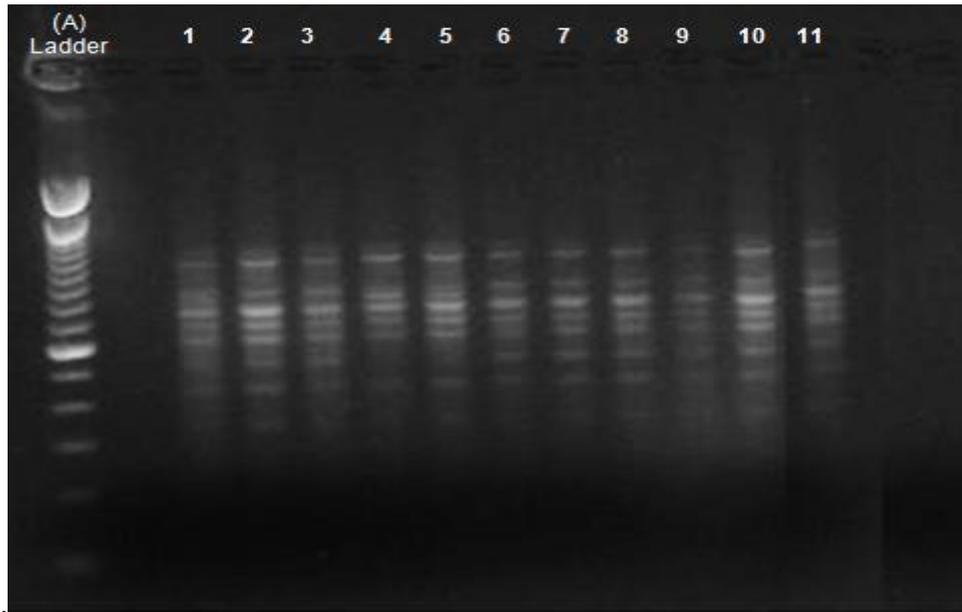


Figura 8 – Produto de amplificação de DNA via PCR com *primer* (AAGC)<sub>4</sub>. A= Ladder de 100 pb. (Reação em Cadeia de Polimerase).

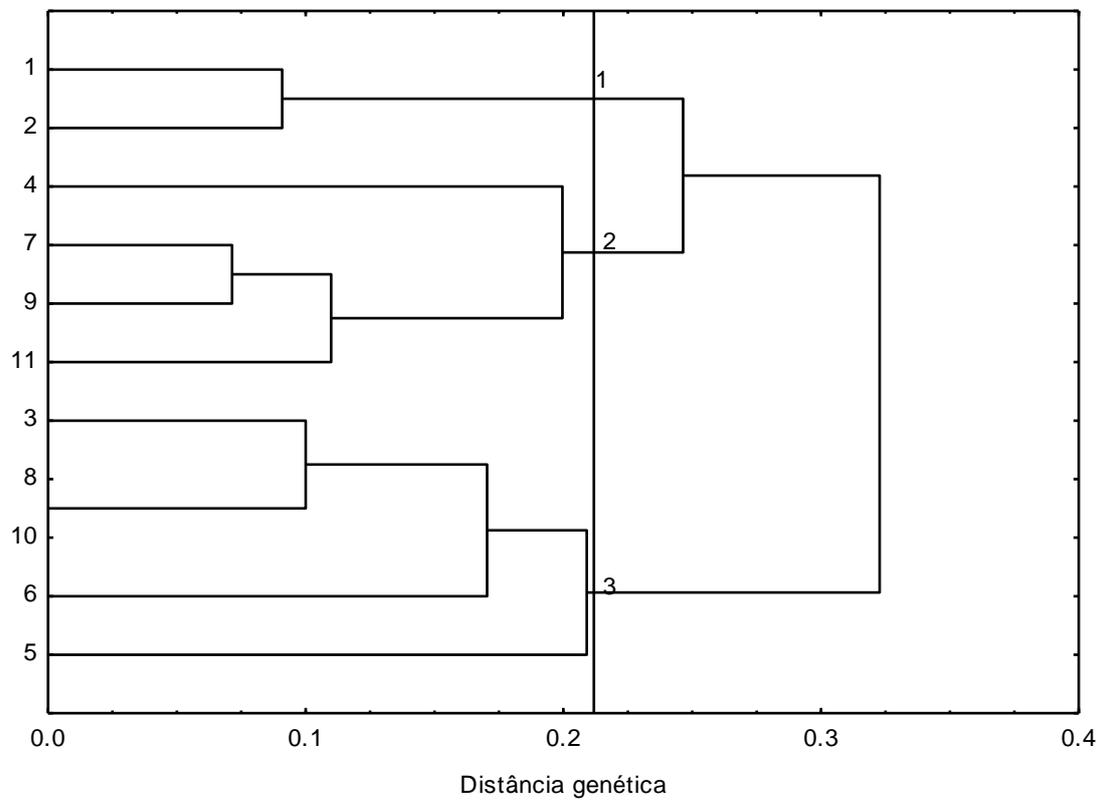


Figura 9 – Dendrograma de dissimilaridades genéticas de dados moleculares de 11 fenótipos de *Rachycentrum canadum*, bijupirá, obtido pelo método UPGMA fundamentado na distância generalizada de Jaccard.

Dos quatro *primers* de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) selecionados foram gerados um total de 14 bandas das quais 35% foram consideradas polimórficas, com uma média de 4,0 bandas por *primer*. O número de alelos polimórficos gerados por *primer* variou de 2 a 4.

No dendrograma apresentado na Figura 9, o ponto de corte referente à média das distâncias da matriz de agrupamento baseada nos dados moleculares (0,21), possibilitou a formação de 3 grupos descritos na Tabela 3, dos quais o segundo grupo apresentou maior homogeneidade com o terceiro grupo (0,2) e o primeiro grupo com uma maior distância entre eles (0,1).

Através da matriz de dissimilaridade foram obtidos os índices pelo método de agrupamento UPGMA, em que é realizada uma comparação dentre os fenótipos e retirada uma média ponderada com base no coeficiente de Jaccard. Pelas comparações, os indivíduos 1 e 3 apresentaram os genótipos mais distantes (0,4615) e os indivíduos 7 e 9 mostraram genótipos mais próximos (0,714).

A partir dessas informações se torna possível afirmar a ausência de variabilidade genética dos animais que estão sendo cultivados na Bahia Pesca. A redução da variabilidade genética tem fortes impactos negativos em populações de peixes nos ambientes de cultivo, causando problemas na sua produção, quando deles se esperam melhores índices zootécnicos e este propósito não é alcançado. Segundo Moreira *et al.* (2001), a ausência de heterogeneidade pode afetar o crescimento dos indivíduos cultivados, como também causar efeitos negativos no seu manejo reprodutivo (MOREIRA *et al.*, 2007). Os efeitos da endogamia são significativos e puderam ser observados no desempenho de peixes ornamentais marinhos utilizados na aquicultura, como relata Fujio & Nakajima, (1992), ao perceber a redução da capacidade de tolerância a salinidade e variações de temperatura do *Poecilia reticulata*.

No entanto, Barrero (2007) argumenta que deve ser levado em consideração a quem desejar implantar um programa de melhoramento genético, piscicultura ou cultivo de qualquer organismo aquático, que a verificação da variabilidade genética dos estoques é de suma importância para a formação de uma base genética suficientemente ampla que seja possível atender tais objetivos. Com intuito de não promover a similaridade entre os indivíduos cultivados é interessante que seja mantido um bom manejo reprodutivo, visto que tal situação sob má administração se torna irreversível, e somente é corrigida com a introdução de novos parentais que poderão ser utilizados como reprodutores.

A produção de peixes jovens que tenham a heterose desejada não demanda somente de possuir um estoque de reprodutores com tal característica, e sim fornecer o manejo reprodutivo adequado para que se mantenha a divergência genética ou até mesmo maximize-a, como foi observado no estudo realizado por Povh *et al.* (2009) num programa de monitoramento genético realizado com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

<b>Distância Genética</b>	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>
<b>Indivíduos</b>	1	4	3
<b>Indivíduos</b>	2	7	8
<b>Indivíduos</b>	--	9	10
<b>Indivíduos</b>	--	11	6
<b>Indivíduos</b>	--	--	5

Tabela 3 – Relação dos grupos delimitados pela matriz de agrupamento dos dados moleculares.

Contudo, mesmo que as matrizes estejam geneticamente conservadas o manejo inadequado destas levam a endogamia e rápido declínio na diversidade genética, na qual causa a eliminação de alelos raros provenientes de peixes selvagens e afetam a rusticidade e os atributos do estoque. Portanto, manter um alto número populacional de reprodutores e evitar o cruzamento entre os indivíduos derivados de um mesmo parental geralmente são medidas recomendadas para evitar um gargalo genético em peixes produzidos na aquicultura e desta forma, atribuir boa qualidade aos organismos gerados na produção (TANIGUCHI & NAKAJIMA, 2001).

## 6. CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível montar um banco genético “in vitro” de DNA preservado de 33 exemplares cultivados na fazenda experimental Oruabo pertencente a Bahia Pesca.

A análise citogenética possibilitou caracterizar a espécie *Rachycentron canadum* a partir das preparações cromossômicas realizadas por meio da comparação de dois protocolos descritos. O melhor resultado obtido para observação e análise das células metafásicas foi através do método fornecido por Gold *et al.* (1990) adaptado por Novaes (2012). *Rachycentron canadum* apresentou um número modal de 48 cromossomos sendo um par submetacêntrico, dois pares subtelocêntricos e 21 pares acrocêntricos.

Para as análises moleculares foi encontrado um padrão polimórfico característico variando de três a cinco bandas utilizando o primer (GGAC)<sub>4</sub>. Com os *primers* (TAGG)<sub>4</sub> e (AAGC)<sub>4</sub> foi encontrado um padrão monomórfico, sendo o primeiro apresentando um padrão com duas bandas e o segundo com sete bandas.

Com os resultados moleculares pode-se evidenciar que os indivíduos estudados apresentaram baixa variabilidade genética, no qual faz-se necessária a introdução de novos indivíduos no plantel de reprodutores da Bahia Pesca.

Com o presente trabalho verificou-se que a técnica (SPAR-PCR/ISSR) foi eficiente para a caracterização genética de peixes, em destaque para a espécie *Rachycentron canadum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, Igrid Vilar. **Levantamento cariotípico em espécies de peixes marinhos costeiros de fundo arenoso (Osteichthyes, Perciformes)**. 2007. 81 f. Dissertação (Genética e Biologia Molecular) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- ACCIOLY, I. V.; MOLINA, W. F. Contribuição à citogenética dos gêneros *Pomadasys* e *Anisotremus* (Haemulidae, Perciformes). **Publca**, Natal, n. 3, p. 36-44, 2007.
- ACCIOLY, I. V.; MOLINA, W. F. Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). **Genetics and Molecular Research**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 358-370, 2008.
- AFFONSO, P.; GALETTI, P. M. Genetic diversity of three ornamental reef fishes (Families Pomacanthidae and Chaetodontidae) from the Brazilian coast. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 67, n. 4, 2007.
- ARAÚJO, W. C. **Inferências carioevolutivas sobre grupos crípticos de peixes marinhos e estuarinos**. 2009. 84 f. Dissertação (Genética e Biologia Molecular) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Spawning of cobia (*Rachycentron canadum*) in captivity. **Journal of the World Aquaculture Society**, United States, v. 33, n. 2, p. 205-207, jun. 2002.
- ARTONI, R.; VICARI, M.; BERTOLLO, L. Citogenética de Peixes Neotropicais: métodos, resultados e perspectivas (Neotropical Fish Cytogenetics: methods, results and perspectives). **Biological and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 43-60, 2000.
- ARTONI, R.F.; MATIELLO, M.C.A. Genética de peixes neotropicais. I. Aspectos da conservação genética dos peixes no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 7-15, 2003.
- BARRERO, N. M. L. **Diversidade genética de *Brycon orbignyannus* em sistema reprodutivo seminatural**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- BIANCHI, G. **Field guide to the commercial marine and brackish-water species of Pakistan**. FAO, Rome, p. 200, 1985.
- BIGNOTTO, T. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; MANIGLIA, T. C.; BONI, T. A.; LUCIO, L. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, R. A.; OLIVEIRA, A. V.; JULIO-JUNIOR, H.F.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná river basin. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 681-689, 2009.
- BRIGGS, J. C. A list of Florida fishes and their distribution. **Biol. Sci.**, v. 2, p. 221-318, 1958.
- BRUM, M. J. I. Correlações entre filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. **Sociedade Brasileira de Genética – Série Monografias**, v. 2, p. 5-42, 1995.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, 2005.

CASTRO, A. L. B.; JÚNIOR, H. F. J.; SANTOS, I. C. **Citogenética de Peixes**. Nupélia. Disponível em: <<http://www.nupelia.uem.br/setores/laboratorios/citogenetica-de-peixes>>. Acesso em: 6 ago. 2012.

CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O Futuro da Pesca da Aquicultura marinha no Brasil: a maricultura. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 3, p. 38-39, 2010.

CHOU, R. L.; SU, M. S.; CHEN, H. Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, Taiwan, n. 193, p. 81-89, 2000.

CIPRIANO, Roger Raupp. **Estudos citogenéticos em teleósteos marinhos pertencentes a baía do Paranaguá – Paraná, Brasil**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CRAIG, S. R.; SCHWARZ, M. H.; MCLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**, United States, v. 261, p. 384-391, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa GENES** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **El estado mundial de la pesca y acuicultura**, Roma, 2010.

FAHAY, Michael. **Early Stages of Fishes in the Western North Atlantic Ocean**. Nova Scotia, Canada, 2007.

FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to acute or gradual changes in salinity. **Aquaculture**, United States, n. 245, p. 275-283, oct. 2006.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813 1993.

FOURMANOIR, P. **Poissons teleosteens des eaux malagaches du Canal de Mozambique**. Ed. I, p. 316, 1957.

FUJIO, Y.; NAKAJIMA, M. Estimation of genetic load in guppy population. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 58, p. 1603–1605, 1992.

GALETTI JR., P. M.; AGUILAR, C. T.; MOLINA, W. T. An overview of marine fish cytogenetics. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 55-62, 2000.

GALETTI JR., P. M.; MOLINA, W. F.; AFFONSO, P. R. A. M.; AGUILAR, C. T. Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. **Genetica**, v. 126, p. 161-177, 2006.

GOLD, J. R.; LI, Y.C.; SHIPLEY, N. S.; POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome-banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 563-575, 1990.

- GUEDES, A. A. S.; BIMBATO, E. P.; OLIVEIRA, A. V.; DELARIVA, R. L.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P. Polimorfismo molecular em populações de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do rio Ivaí. *In: IV Mostra interna de trabalhos de iniciação científica do Cesumar*, 4., 2008, Maringá. **Anais IV Mostra interna de trabalhos de iniciação científica do Cesumar**. Maringá, 2008. p. 1-5.
- GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- HAIMOVICI, M.; KLIPPEL, S. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE. Biblioteca Universitária. **Diagnóstico da Biodiversidade de Peixes Teleósteos Demersais Marinhos e Estuarinos do Brasil**. Rio Grande, 1999.
- HATCHELLI, G. W. Sea-fishing on the Tanganyika coast. **Tanganyika Notes and Records**, v. 37, p. 1-39, 1954.
- HILSDORF, A.; KRIEGER, J. E. Biologia molecular na conservação de peixes: ferramentas moleculares e conservação genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.5, p. 10-12, 1998.
- HUREAU, J. C.; MONOD, T. Checklist of the fishes of the northern-eastern Atlantic and of the Mediterranean. **UNESCO**, v. I, p. 371-372., 1973.
- IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**, Brasília, 2006.
- JACOBINA, U. P.; CIOFFI, M. de B.; SOUZA, L. G. L.; CALADO, L. L.; TAVARES, M.; MANZELLA, J. Jr.; BERTOLLO, L. A. C.; MOLINA, W. F. Chromosome mapping of repetitive sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae): implications for karyotypic evolution and perspectives for biotechnological uses. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Natal, v. 2011, n.8, p. 218-231, 2011.
- JONHSON, G. D. Percoidei: **Development and Relationships. In: Ontogeny and Systematic of Fishes**. 1. ed. California: American Society Ichthyologists and Herptologists, 1984. p. 464-498.
- JORDAN, D. S.; SEALE, A. The fishes of Samoa; description of the species found in the archipelago, with a provisional check-list of the fishes of Oceania. **Bull. U.S. Bur. Fish**, v. 25, p. 173-455, 1906.
- KENNETH, A.; WEBB JR.; HITZFELDER, G. M.; FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 264, p. 223-227, 2006.
- KIRPICHNIKOV, V. S. Genetic bases of fish selection. I Ed. p. 410. 1981.
- LA MONTE, F. **Marine game fishes of the world**. Doubleday & Co., NY. p. 190, 1952
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LINDBERG, G. V.; KRASYUKOVA, Z. V. **Fishes of the Sea of Japan and the adjacent areas of the Sea of Okhotsk and the Yellow Sea**. Part 3. Teleostomi. XXIX. Perciformes, p. 498, 1971.

LINNAEUS, C. *Systema natura*, 12th ed., Reprinted by Brit. Min. Nat. Hist., London. p. 491.1766.

LUCIO, L. C.; PRIOLI, A. J.; MANIGLIA, T. C.; PRIOLI, S. M. A. P.; JULIO JR, H. F.; PAZZA, R. O.; GALDINO, J. C.; CARLOS, V. A.; PERIOTO, P. S.; PANARARI, R. S.; OLIVEIRA, A. V. Identificação de grupos dentro de *Hoplias malabaricus* na planície de inundação do alto do rio Paraná, utilizando marcadores moleculares SPAR. *In*: Congresso Nacional de Genética, 47°. 2001, Águas de Lindoia. **Anais do Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindoia, 2001. p. 240-247.

MARTIN, P. G.; OLIVEIRA, A. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P. Caracterização molecular de populações de *Steindachnerina* (Pisces, Characiformes) da planície alagável do Alto do rio Paraná. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2009.

MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F.; WASKO, A. P.; LEITÃO, G. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura: marcadores genéticos na piscicultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.28, p.12-15, 2002.

MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.

MENNI, R. C.; RINGUELET, R. A.; ARANBURU, R.H. **Peces marinos de la Argentina y Uruguay**. Ed. Hemisferio sur S.A., 359 p. 1984

MINGOTI, S.A., **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 295p.

MÖLLER, M.; PINHEIRO, J. B. Comparações e novas abordagens no desenvolvimento de marcadores microssatélites. *In*: SEMINÁRIOS EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. 200 p.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, abr. 2007.

MOTTA NETO, C. C. **Haemulidae, modelo cariotípico de estase evolutiva**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

NAKAJIMA, M.; TANIGUCHI, N. Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture. **Genetica**, v. 111, p. 279-289, 2001.

NAKAJIMA, M.; TANIGUCHI, N. Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture. **Genetica**, v. 111, p. 279-289, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4.ed. Nova York: John Wiley and Sons Inc., 2006. 624 p.

NETTO, M. R. C. B.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Homogeneidade Cariotípica Populacional de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* de Diferentes Ambientes Costeiros. In: X SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTOCA DE PEIXES, 2004, Natal. **Anais do X Simpósio de Citogenética e genética de Peixes**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004. p.110.

NICHOLS, J. T.; BREDER JR, C. M. The marine fishes of New York and southern New England. *Zoologica*, **New York**, v. 9, n. 1, p. 192, 1926.

NOVAES, L. F. **Caracterização genética do bijupirá (*Rachycentron canadum*) por meio de marcadores citogenéticos e moleculares cultivados na Bahia Pesca**. 2012. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. Principais problemas enfrentados atualmente pela aqüicultura brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. 2008. Brasília: SEAP, 2008. p.135-158.

PLANTAS, 2009, Piracicaba. **Anais Seminário em genética e melhoramento de plantas**. Piracicaba: Departamento de Genética, 2009.

PERES, Wellington Adriano Moreira. **Análise da diversidade cariotípica de Characidae da baía do são Francisco**. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; GOMES, P. C.; BLANCK, D. V.; VARGAS, L.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Monitoramento da variabilidade genética do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 61, n. 5, 2009.

RELYEA, K. **Inshore fishes of the Arabian Gulf**. George Allen & Unwin, London, p. 149, 1981.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2a ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHES, E. G.; SECKENDORFF R. W. V.; HENRIQUE, M. B.; FAGUNDES, L.; SEBASTIANI, E. F. Viabilidade econômica do cultivo do bijupirá (*Rachycentron canadum*) em sistema offshore. **Informações Econômicas**, v. 38, n. 12, 2008.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. FAO Fisheries Synopsis, 153, U.S. Dep. Commer., NOAA Technical Report NMFS 82, p.21, 1989.

SHIKANO, T.; CHIYOKUBO, T.; TANAGUCHI, N. Effect of inbreeding on salinity tolerance in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Aquaculture**, v. 202, p. 45-55, 2001.

SMITH, J. L. B. **The sea fishes of southern Africa**. Central News Agency, South Africa, 580 p. 1965

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOUZA, C. A.; FORESTI, F. P.; PRADO, F. D.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F. Marcadores citogenéticos empregados na piscicultura nacional: região organizadora de nucléolo, CMA3, DNAr5S e 18S no híbrido interespecífico “cachapira”. *In*: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, XXI., 2009, São Jose do Rio Preto. **Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. São José do Rio Preto, 2009. p. 2290- 2293.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

SUN, L.; CHEN, H.; HUANG, L.; WANG, Z.; YAN, Y. Growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) relative to ration. **Aquaculture**, United States, v. 257, p. 214-220, 2006.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, v. 15, n. 5, p. 199-202, 2000.

UENO, T. On two rare pelagic fishes, *Luvarus imperiaUs* and *Rachycentron canadum*, recently captured at Yoichi, Hokkaido, Japan. **Jpn. J. Ichthyol.**, v. 12, n. 3-6, p. 99-103, 1965.

WALMSLEY, Sandra Menezes. **Identificação de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de marcadores moleculares**. 2004. 113 f. Tese (Doutorado em Aquicultura – Área de Concentração em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

WEBB, K. A.; HITZFELDER, G. M.; FAULK, C. K; HOLT, G. J. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquacultures system. **Aquaculture**, Texas, v. 264, p. 223-227, 2007.

## ANEXO A – SISTEMA DE CULTIVO OFFSHORE DO BIJUPIRÁ.



Fonte: <http://www.aquaculturehub.org>

## ANEXO B – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA BAHIA PESCA – FAZENDA ORUABO, SANTO AMARO/BA. LOCAL ONDE FORAM REALIZADAS AS AMOSTRAGENS.



Fonte: <http://googlemaps.com>

**ANEXO C – MATRIZ DOS DADOS GENÉTICOS ONDE OS NÚMEROS SEGUIDOS DA LETRA (A) REPRESENTAM OS INDIVÍDUOS DE MAIOR SIMILARIDADE E OS NÚMEROS SEGUIDOS DA LETRA (B) OS MAIS DISSIMILARES.**

Indivíduos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0,000	0,091	0,462(B)	0,308	0,385	0,538	0,286	0,385	0,214	0,385	0,231
2	0,091	0,000	0,417	0,250	0,333	0,500	0,231	0,333	0,286	0,333	0,167
3	0,462(B)	0,417	0,000	0,333	0,273	0,111	0,308	0,100	0,357	0,100	0,250
4	0,308	0,250	0,333	0,000	0,250	0,417	0,154	0,250	0,214	0,250	0,231
5	0,385	0,333	0,273	0,250	0,000	0,200	0,231	0,182	0,286	0,182	0,167
6	0,538	0,500	0,111	0,417	0,200	0,000	0,385	0,200	0,429	0,200	0,333
7	0,286	0,231	0,308	0,154	0,231	0,385	0,000	0,231	0,071(A)	0,231	0,077
8	0,385	0,333	0,100	0,250	0,182	0,200	0,231	0,000	0,286	0,000	0,167
9	0,214	0,286	0,357	0,214	0,286	0,429	0,071(A)	0,286	0,000	0,286	0,143
10	0,385	0,333	0,100	0,250	0,182	0,200	0,231	0,000	0,286	0,000	0,167
11	0,231	0,167	0,250	0,231	0,167	0,333	0,077	0,167	0,143	0,167	0,000