



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Wilma Brandão de Andrade

Caracterização genética da espécie *Lutjanus synagris*
por meio de marcadores ISSR

Cruz das Almas/BA

2013

Wilma Brandão de Andrade

**Caracterização genética da espécie *Lutjanus synagris*
por meio de marcadores ISSR**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Soraia Barreto A. Fonteles

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira

Cruz das Almas/BA

2013

A553

Andrade, Wilma Brandão de.

Caracterização genética da espécie *Lutjanus synagris* por meio de marcadores ISSR / Wilma Brandão de Andrade._ Cruz das Almas, BA, 2013.

43f.; il.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Soraia Barreto Aguiar Fonteles,
Co – orientação: Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira

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

1. Peixe – Variabilidade genética. 2. Marcadores moleculares
Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 639.3

Wilma Brandão de Andrade

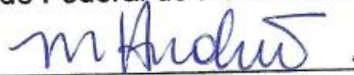
Caracterização genética da espécie *Lutjanus synagris* por meio de
marcadores ISSR

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

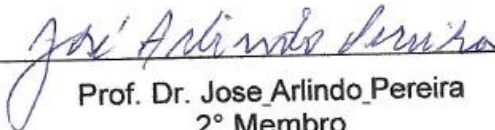
Aprovada em 55/05/2013



Prof. Dr^a. Soraia Barreto Aguiar Fonteles.
Orientadora
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr^a. Maria Vanderly Andrea
1^o Membro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Jose Arlindo Pereira
2^o Membro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Um homem que ousa desperdiçar uma hora, ainda não descobriu o valor da vida”.

Charles Darwin

Agradecimentos

A Deus pela minha existência, por me conduzir sempre no caminho certo. Presença constante em minha vida. Fortalecendo-me principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Wilson e Raimunda que sempre estiveram presentes, insuflando de amor e confiança, agradeço pelos ensinamentos, criação e formação do meu caráter.

A minha professora orientadora Soraia Fonteles pela oportunidade, ensinamentos, conselhos, orientação, contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e intelectual e pela amizade, acima de tudo.

Ao meu co-orientador Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira por compartilhar o seu saber, pelo apoio e amizade, contribuindo para a minha formação acadêmica.

Ao meu irmão Bira, pelo apoio, confiança e admiração que sempre depositou em mim.

Aos meus amigos Hiago, Ana Carolina, Maria Thiêta, Bárbara, Patricia Faquinello, Janaira, Rafaella, Yslai, Gilmara, Carlos Aguilar, Cátia, Rafael, Naíra, Laise, Líliam, Stefany, Silvânia, Guilherme e a todos os outros, pela amizade, torcida e apoio nos trabalhos.

Aos meus familiares, Minha Vó Claudionora, Rita Solange, Everton, Alisson, Jacileide, Dayane, Joílson, Marcos, Janaina, que mesmo longe sempre estão torcendo por mim.

A UFRB pela oportunidade oferecida e ao laboratório do NEPA, por me acolher e me proporcionar o conhecimento.

RESUMO

A família Lutjanidae, é composta por cerca de 125 espécies, tipicamente tropical, com a distribuição de seus representantes coincidindo, a grosso modo, com a ocorrência de formações recifais e de pouca profundidade. São relativamente abundantes no Nordeste, onde também tem grande importância comercial. O presente trabalho teve como principal objetivo testar protocolos para extração de DNA em tecidos de interesse e caracterizar duas populações *Lutjanus synagris*, através de marcadores ISSR, a existência de variabilidade genética dentre os indivíduos. Dentre os protocolos estudados o acetato apresentou melhor visualização e dentre os tecidos, o músculo possibilitou visualmente melhor qualidade e quantidade de DNA extraído. Verificou-se que os marcadores ISSR foram eficientes para a caracterização genética das populações, revelando a troca de alelos em comum contribuindo num baixo fluxo gênico. Para a espécie *L. synagris*, os dois iniciadores ISSR utilizados permitiram a distinção dos genótipos estudados e foram satisfatórios para a detecção de polimorfismo e a análise de agrupamento efetuada com os genótipos permitindo visualizar a proximidade dos genótipos oriundos do Ceará e Bahia.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Protocolo de extração. Variabilidade Genética.

ABSTRACT

The family Lutjanidae, comprises about 125 species, typically tropical, with the distribution of its representatives coinciding roughly with the occurrence of reef formations and shallow. Are relatively abundant in the Northeast, which also has commercial importance. This study aimed to test protocols for DNA extraction in tissues of interest and characterize two populations *Lutjanus synagris* through ISSR markers, the genetic variability among individuals. Among the studied protocols acetate showed better visualization and among tissues, muscle enabled visually better quality and quantity of extracted DNA. It was found that ISSR were efficient for the genetic characterization of populations, revealing the exchange of alleles in common contributing a low gene flow. For the species *L. synagris*, the two ISSR primers used allowed the distinction of genotypes and were satisfactory for the detection of polymorphism and cluster analysis performed with genotypes allowing visualizing the proximity of the genotypes obtained from Ceará and Bahia.

Key-words: Molecular markers. Protocol extraction. Genetic variability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espécie <i>Lutjanus synagris</i>	12
Figura 2: Área de maior incidência da espécie.....	17
Figura 3: Características morfológicas	18
Figura 4: Características morfológicas dos dentes.....	19
Figura 5: Aspectos gerais de <i>Lutjanus synagris</i> em hábitat de águas rasas	21
Figura 6: Aspectos gerais de <i>Lutjanus synagris</i> em hábitat de águas profundas.....	21
Figura 7: Armazenamento e preservação das amostras	26
Figura 8: Produto da extração de DNA com o protocolo de acetato de amônia.....	31
Figura 9: Produto da extração de DNA com o protocolo Fenol-clorofórmio	32
Figura 10: Produto da extração de DNA utilizando o protocolo acetato de amônia nos tecidos fígado (a) e coração (b), nas amostras da <i>Lutjanus synagris</i>	33
Figura 11: Amplificação do DNA pela PCR utilizando o <i>primer</i> (GGAC) ₄	34
Figura 12: Amplificação do DNA pela PCR utilizando o <i>primer</i> (GACA) ₄	34
Figura 13: Coordenadas principais dos eixos 1/2 de 49 baseado em marcadores ISSR	36
Figura 14: Dendograma derivado através de UPGMA, baseado em marcadores ISSR.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA1: Programa de amplificação do DNA para o *primer* (GGAC)₄ 29

TABELA 2: Programa de amplificação do DNA para o *primer* (GACA)₄.....29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Histórico da exploração da espécie	15
3.2 Distribuição e hábitat da espécie	16
3.3 Características morfológicas.....	17
3.4 Importância econômica.....	19
3.5 Características comportamentais	20
3.6 Caracterização genética	22
3.6.1	22
4 OBJETIVO	25
4.1 Objetivo geral.....	25
4.2 Objetivo específico	25
5 MATERIAS E MÉTODOS	26
5.1 Extração de DNA.....	27
5.2 Reações de amplificação de DNA via pcr.....	29
5.2.2 Quantificação de DNA em gel de agarose.....	29
5.2.3 Amplificação do DNA via ISSR.....	29
5.3 Análise estatística dos dados.....	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a biologia e ecologia de Lutjanídeos têm sido estudadas e revisadas intensamente. A ordem Perciformes é considerada a maior entre os vertebrados, com exemplares presentes em quase todos os ambientes aquáticos (marinhos, estuarinos e de água doce) em todo o mundo também por ser a maior em número de espécies entre os vertebrados (NELSON 2006).

A família Lutjanidae, é composta por cerca de 125 espécies, tipicamente tropical, com a distribuição de seus representantes coincidindo, a grosso modo, com a ocorrência de formações recifais (MACHADO *et al.*, 2003) e de pouca profundidade, porém algumas se encontram a 200 m ou mais de profundidade. As espécies de águas rasas são em geral de hábitos tróficos noturnos, sendo que durante o dia se encontram entre as formações recifais, solitárias ou formando grupos mais ou menos numerosos (CERVIGÓN, 1993).

Peixes da espécie *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) são popularmente conhecido no Brasil como ariacó, areocó, luciano-riscado, vermelho Henrique ou simplesmente vermelho; nos Estados Unidos da América como “lane snapper”, “candy striper” e “rainbow snapper”; em Cuba como “biajaiba”; no México como “villajaiba” e em Porto Rico como “rayado”. Contudo, os nomes populares mais utilizados são “lane snapper” em inglês, “vivaneau gazou” em francês e “pargo biajaiba” em espanhol (FAO, 1985).



Fonte: Wilma Brandão

Figura 1: Ariacó, *Lutjanus synagris*

O ariacó possui a seguinte classificação taxonômica:

Reino ----- Animalia

Filo ----- Chordata,

superclasse ----- Osteichthyes

Classe ----- Osteichthyes

Subclasse ----- Neopterygii

Infraclasse ----- Teleostei

Superordem ----- acanthopterygii

Ordem ----- Perciformes

Família ----- Lutjanidae

Subfamília ----- Lutjaninae

Gênero ----- Lutjanus

Espécie ----- *Lutjanus synagris*

(LINNAEUS, 1776)

No Brasil, a espécie é relativamente abundante no Nordeste, onde também tem grande importância comercial. As espécies do grupo estão entre as categorias de pescado mais valiosas no mercado, sendo consideradas como peixe de primeira qualidade em todos os estados. Os lutjanídeos formam

importantes recursos pesqueiros em águas tropicais e subtropicais, onde são capturados pela pesca comercial, artesanal e recreativa por meio de espinhéis, redes de emalhe de fundo, anzóis com linha de mão, armadilhas, pesca submarina e, ocasionalmente, por redes de arrasto. No caso específico do ariacó, a pesca é conhecida como “pesca de choque”, onde os peixes são pescados e congelados vivos, a fim de manter a cor vermelha característica do grupo, o que aumenta seu valor comercial e torna a pesca “tipo exportação” (RESENDE et al., 2003).

As primeiras investigações sobre *L. synagris* no Brasil foram realizadas no estado do Ceará, onde a idade e o crescimento foram estudados por ALEGRIA & MENEZES (1970) e a fecundidade por GESTEIRA & ROCHA (1976). Na costa baiana, dois estudos foram realizados: CARIA (2000) estudou aspectos da biologia reprodutiva no litoral norte e LIMA (2004) avaliou a idade e crescimento.

No Brasil, esforços em pesquisa estão sendo realizados para viabilizar o cultivo comercial de pelo menos cinco espécies, o camurim ou robalo flecha, *Centropomus undecimalis*, a garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus*, o beijupira, além de lutjanídeos (cioba, *Lutjanus analis*, ariacó, *Lutjanus synagris*). Em termos de produção mundial para o gênero *Lutjanus* a produção reportada pela FAO(2012) foi de apenas 8.230 ton (ALBERTO, 2013).

2. JUSTIFICATIVA:

Um dos principais efeitos diretos da pesca está na redução da abundância de espécies alvo. Além disso, a pesca pode também modificar características evolutivas na população, através da remoção seletiva de indivíduos maiores e de crescimento mais rápido (PAULY et al., 1998). A diminuição de capturas incitou a American Fisheries Society a reconhecer que os lutjanídeos devem ser manejados conservativamente, de forma que sejam evitadas situações de sobrepesca e colapso dos estoques (COLEMAN et al 2000, apud REZENDE et al 2003).

O gerenciamento dos recursos pesqueiros vivos marinhos e estuarinos depende essencialmente da disponibilidade de informações sobre a biologia e a pesca dos recursos pesqueiros explorados. É também importante que se disponha de informações acerca da diversidade genética das espécies observando e detectando variabilidade entre elas. De posse dessas informações aqueles estoques que apresentarem maior variabilidade deverão sofrer medidas prioritárias de regulamentação da captura (defeso, tamanho mínimo de captura, etc.) por se tratar de um banco genético “in situ” a ser preservado. Essas medidas são valiosas quando se trata de espécies sobreexploradas e que se intenciona o manejo dos estoques para a preservação dos mesmos e/ou o cultivo como uma maneira de reduzir os impactos provocados pelas capturas excessivas nos estoques naturais.

Enquanto o ambiente natural está sendo danificado 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, isolamento reprodutivo, dentre outras, que tornam a diversidade genética e biológica enfraquecida ao longo dos anos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico da exploração da espécie

A exploração comercial dos Lutjanídeos na costa ocidental do Oceano Atlântico teve início em 1800 na América Central (insular e continental) e no sul dos EUA. Somente um século mais tarde se iniciava a exploração recreacional deste grupo na América Central, que é tradicionalmente capturado com linha e anzol de fundo (POLOVINA & RALSTON, 1987).

Espécies de peixes demersais da família Lutjanidae vêm sendo exploradas pela pesca comercial na costa norte/nordeste do Brasil, desde a introdução das linhas pargueiras pelos portugueses, durante os anos 50 e 60, com o propósito de diversificar as pescarias de atum e lagosta que já se encontravam em declínio. No início dos anos 60 foram realizadas com sucesso algumas pescarias na costa dos estados do Maranhão, Piauí e Ceará e, também nos bancos oceânicos do Ceará, Caiçaras e Atol das Rocas (FONTELES-FILHO, 1969). O ano de 1961 pode ser considerado como o ano em que se iniciou efetivamente a pesca comercial dos estoques da família Lutjanidae, que passou por períodos de elevada produção, com tendência de declínio a partir do final dos anos 80 (IVO & SOUSA, 1988; XIMENES & FONTELES-FILHO, 1988).

As capturas de lutjanídeos são significantes em volume e tem alto valor econômico, devido à alta qualidade da carne e a alta demanda, fazendo com que suas espécies sejam as mais apreciadas nos mercados hoje. Entretanto há uma discussão com relação à saúde dos estoques de lutjanídeos. No Golfo do México o vermelho (*L. campechanus*) e o vermelhão (*Rhoboplites aurorubens*) encontram-se em situação de sobrepesca (COLEMAN et al., 2000). O pargo cubera (*L. 28 cyanopterus*) e a cioba (*L. analis*) são listados como vulneráveis pela União Internacional para Conservação da Natureza, e consideradas em risco de extinção (IUCN, 2000).

No Golfo do México o vermelho (*L. campechanus*) e o vermelhão (*Rhoboplites aurorubens*) encontram-se em situação de sobrepesca (COLEMAN et al., 1999). O pargo cubera (*L. 28 cyanopterus*) e a cioba (*L. analis*) são listadas como vulneráveis pela União Internacional para Conservação da Natureza, e consideradas em risco de extinção (IUCN, 2000).

Atualmente, a pesca dos Lutjanídeos evoluiu para a estratificação e diversificação, ao longo de toda a costa norte e nordeste, se estendendo até o sul da Bahia, contribuindo significativamente nos desembarques controlados destas regiões (FERREIRA et al., 2001; IBAMA, 2001).

Segundo Magalhães *et al.* (2003) as espécies *Lutjanus analis*, *L. jocu*, *L. vivanus* e *L. synagris* revelaram-se recursos pesqueiros importantes em desembarques na região Nordeste do Brasil. De acordo com estes autores, os peixes da família Lutjanidae são caracterizados por apresentarem crescimento lento e longevidade média a alta (vinte a trinta anos) o que torna estas espécies altamente vulneráveis à sobrepesca.

Os Lutjanídeos, continuam como o segundo recurso mais importante no estado do Ceará, mas as estatísticas provavelmente incluem capturas desta espécie efetuadas pela frota nordestina, que se concentra e opera na região Norte, na plataforma continental dos estados do Pará e Amapá (SOUZA, 2000).

3.2 Distribuição e habitat da espécie

A espécie *Lutjanus synagris* se distribui através dos trópicos, indo do Oceano Atlântico Ocidental desde o estado norte americano da Carolina do Norte até o estado de São Paulo no Brasil (Figura 2), sendo encontrados em fundos rochosos e coralíneos ou recifais, entre profundidades de 2 até 400 m de profundidade (CARVALHO-FILHO, 1999). São carnívoros generalistas alimentando-se principalmente de crustáceos e peixes, apresentando estratégias de alimentação noturna e crepuscular, além de serem sexualmente gonocóricos e na fase adulta, atingem um comprimento máximo de aproximadamente 40 cm (LOWE-MCCONNELL, 1991; GRIMES, 1987; MENEZES & FIGUEIREDO, 1980).



Figura 2 – Área de maior incidência do ariacó, *Lutjanus synagris*. Fonte: FAO (1985).

3.3 Características morfológicas

Segundo descrição da Smithsonian Marine Station at Fort Pierce (2010), os exemplares de peixes desta espécie possuem corpo achatado látero-lateral e moderadamente alto. A nadadeira dorsal é contínua com dez espinhos, sendo o quarto o que apresenta maior tamanho variando entre doze a treze raios. Possui nadadeira anal arredondada, característica que o distingue das outras espécies do gênero nas formas juvenis, com três espinhos, sendo o segundo mais robusto e de comprimento igual ao terceiro, e possuindo de oito a nove raios. A nadadeira peitoral é curta não atingindo a região do ânus. Em sua cabeça, possuem de três a quatro linhas amareladas que se vão do focinho até a área dos olhos. Enquanto linhas amarelas e diagonais percorrem o corpo acima da linha lateral e também uma série de sete a dez linhas amarelas e horizontais percorre o corpo de ambos os lados. As nadadeiras anal, pélvica e a porção distal da nadadeira dorsal são amarelas enquanto que

a porção proximal da nadadeira caudal é avermelhada. Uma mancha preta difusa, maior que o olho, está localizado acima da linha lateral e abaixo dos raios da nadadeira dorsal. Apresenta escamas pequenas do tipo ctenóide, com 47 a 52 na linha lateral. Possuem 13 ou 14 rastros branquiais inseridos no arco branquial. O perfil da cabeça é quase reto da região posterior da cabeça até a boca, sendo esta, ampla com dentes viliformes em ambas as maxilas e no vômer. Apresenta o pré-opérculo serrilhado superiormente com espinhos maiores no ângulo e tendo sua coloração do corpo mais prateada a rosada ou avermelhada (Figura 3). A maxila superior possui quatro dentes caniniformes dois dos quais são maiores (Figura 4).

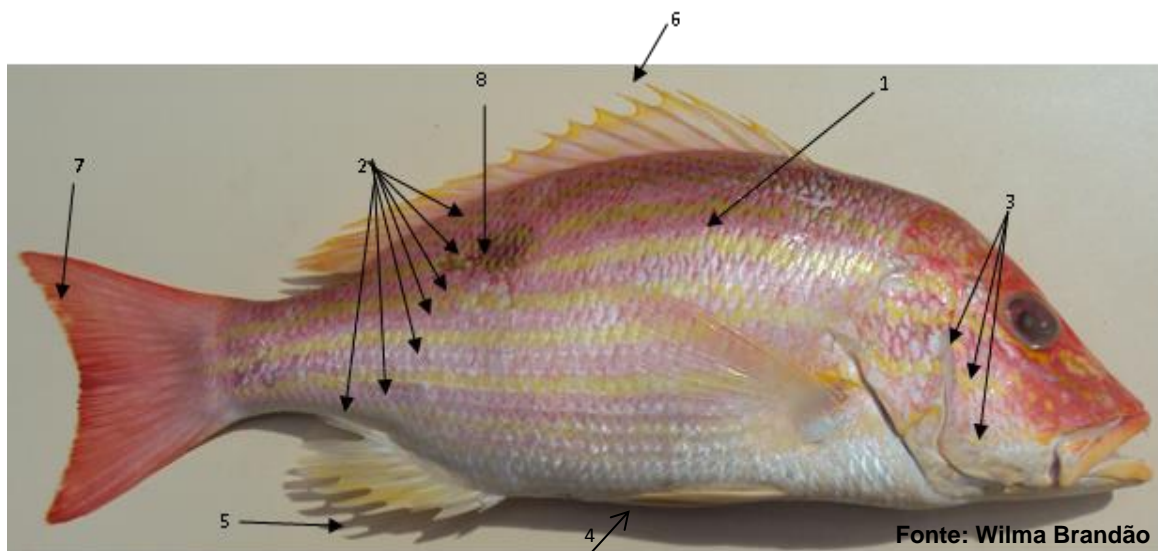


Figura 3: características morfológicas do ariacó, *Lutjanus synagris*. 1: linha lateral; 2: linhas amarelas e horizontais, 3: três a quatro linhas amareladas no focinho, 4: nadadeira peitoral curta, 5: nadadeira anal arredondada contendo três espinhos, 6: nadadeira dorsal contínua, 7: nadadeira caudal, 8: mancha preta difusa, acima da linha lateral.

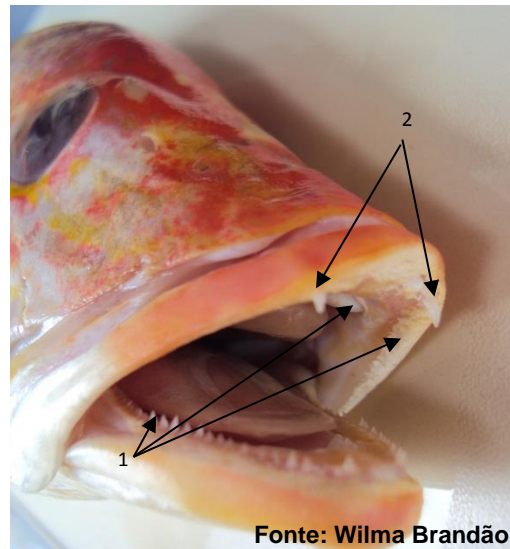


Figura 4: características morfológicas dos dentes do ariacó, *Lutjanus synagris*. 1: Dentes viliformes em ambas as maxilas e no vômer; 2: maxila superior com dentes caniniformes.

3.4 Importância econômica

No início da década de 1970, o ariacó já era considerado como uma espécie de importância econômica no nordeste do Brasil (ALEGRÍA; MENEZES, 1970). Nos dias atuais, as espécies de lutjanídeos ainda estão entre as categorias de pescado mais valiosas nos mercados do Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco, sendo consideradas como peixes de primeira qualidade (REZENDE et al., 2003). Segundo ANDRADE *et al.* (2009) quando comparados com a sardinha (*Opsthonema oglinum*), a tainha (*Mugil spp*) e o camarão (*Penaeus brasiliensis*), o ariacó e a guaiúba foram considerados os pescados de melhor valor nutricional e composição de ácidos graxos para consumo humano.

Os peixes da família Lutjanidae são considerados importantes recursos pesqueiros em toda sua área de ocorrência, sendo que as espécies de peixes demersais dessa família vêm sendo exploradas pela pesca comercial na costa nordeste do Brasil desde a introdução das linhas pargueiras pelos portugueses durante os anos 50 e 60, com o propósito de diversificar a pesca atuneira e lagosteira, que já se encontravam em declínio. Em Pernambuco o “vermelho”

Lutjanus analis passou a ser a principal espécie capturada na década de 80, seguida pela “cioba” ou “guaiúba” *Ocyurus chrysurus*, “dentão” *Lutjanus jocu* e “ariacó” *Lutjanus synagris*. De acordo com resultados obtidos no programa REVIZEE/SCORE-NE nordeste (Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva da região Nordeste do Brasil) as espécies dessa família apresentam crescimento lento e longevidade média a alta entre 20 á 30 anos, características essas que as tornam espécies altamente vulneráveis a sobrepesca, o que reforça a necessidade de criação de programas de manejo voltados para o grupo (REZENDE *et al.*, 2003).

Dados do Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil (ESTATPESCA) (IBAMA, 2000, 2003, 2007) demonstraram que a frota artesanal é a principal responsável pelas capturas de ariacó. Espécies longevas como os lutjanídeos, são geralmente bastante suscetíveis mesmo a baixos níveis de sobre exploração e seus estoques não suportam níveis de mortalidade por pesca muito mais elevada que os níveis de mortalidade natural (REZENDE *et al.*, 2003). Por ser pescado com uma ampla variedade de artes de pesca, o ariacó é facilmente afetado pelo aumento do esforço de pesca mesmo de outras espécies (ACOSTA APPELDOORN, 1992).

3.5 Características comportamentais

Durante sua fase de crescimento até sua fase adulta, o ariacó passa por duas fases distintas típicas de seu ciclo de vida. Quando habita águas rasas e próximas à costa, em seu aspecto geral, possui como característica o corpo mais prateado e suas linhas que são acompanhadas na lateral, tem coloração amarelo mais claro, porém sua pinta marcante a cima da linha lateral próxima a nadadeira dorsal, permanece com coloração marcante. Quando posteriormente migram para águas mais profundas até 400 m, (Figura 5), possuem uma coloração mais acentuada, onde a cor do seu corpo é bem mais rosada a vermelho intenso, com suas linhas na lateral do corpo amarelo intenso, (Figura 6). Peixes desta espécie alimentam-se preferencialmente durante a noite e os

principais itens que compõem a dieta são pequenos peixes e caranguejos, camarões, poliquetas, gastrópodes e cefalópodes. Eles chegam a viver 10 anos e atingem comprimento máximo de aproximadamente 50 cm, (FAO, 1985).



Fonte: Wilma Brandão

Figura 5: Aspectos gerais do *Lutjanus synagris*, o ariacó, capturado em habitat de águas rasas e próximas da costa, evidenciando o corpo mais prateado e suas linhas na lateral, tem coloração amarelo mais claro. Fonte: FAO (1985).



Fonte: Wilma Brandão

Figura 6: Aspectos gerais do *Lutjanus synagris*, o ariacó, capturado em habitats de águas mais profundas, evidenciando uma coloração mais acentuada, variando de rosada a vermelho intenso. Fonte: FAO (1985).

3.6 Caracterização genética

Segundo ARTONI & MARTIELLO (2003), existem três razões que justificam a importância dos estudos genéticos em peixes, como forma de

conservação biológica. O primeiro fator, se refere ao Teorema Fundamental da Seleção Natural, as mudanças evolutivas serem 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 *locus* em cromossomos homólogos, mas numa população podem estar representados os diferentes alelos para um mesmo *locus*, o que determina toda a variabilidade genética nela existente.

3.6.1 Marcadores moleculares

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

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para auxiliar programas de conservação e melhoramento de muitas maneiras. Estes estudos, com base na estrutura da diversidade genética são importantes e eficientes para descoberta de genes envolvidos nos fenótipos de interesse. O conhecimento da divergência genética entre os genótipos utilizados em programas de melhoramento permite a organização da variabilidade desses materiais auxiliando a seleção de genitores e potencializando os ganhos genéticos obtidos (PADILHA, 2002). Os marcadores moleculares são ferramentas eficazes no estudo dos genomas, pois detectam polimorfismos diretamente no DNA, não sofrem influência ambiental e são independentes do estágio de desenvolvimento do indivíduo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em geral, os marcadores moleculares são baseados na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e têm sido grandemente utilizados nos programas de melhoramento. Os marcadores moleculares podem ser usados, no estudo da diversidade genética de

populações, na avaliação do potencial dos recursos genéticos disponíveis, na construção de mapas de ligação, por exemplo.

Os descritores de DNA, por sua vez, apresentam a vantagem de representarem o genótipo, mantendo consistência nos resultados, evitando o problema da avaliação dos dados com base na expressão do fenótipo (WÜNSCH & HORMAZA, 2002). A possibilidade de acessar a variabilidade genética diretamente no DNA vem fazendo com que, cada vez mais, sejam disponibilizadas técnicas precisas que possam vir a auxiliar o processo de proteção intelectual de materiais genéticos (PADILHA et al., 2002).

Uma vasta gama de técnicas de marcadores de DNA está disponível para estudos de diversidade genética. Todos os marcadores de DNA refletem diferenças nas sequências de DNA. Inter-simples sequência de repetição (ISSR) PCR é um marcador multilocus simples, custo-eficiente, robusto, método marcador útil na determinação de variabilidade genética (REDDY *et al.*, 2002). Os produtos de PCR assim gerar perfis multilocus, que podem ser analisadas em géis de agarose ou de poliacrilamida (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

A utilização de marcadores ISSR permite resultados altamente reprodutíveis a serem obtidos sem qualquer informação prévia da sequência de DNA (FRANÇOISE & BRANCHARD, 2001). ISSRs são amplamente utilizados em plantas para uma variedade de aplicações (Wolfe et al, 1998;. LEROY & LEON,2000), mas que vem sendo também utilizados em estudos com animais em geral.

O ISSR utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador (Olii) para amplificar um fragmento de DNA delimitado por dois microsatélites invertidos, o que gera um alto nível de polimorfismo (BORNET & BRANCHARD 2004).

Segundo uma conceituação mais clássica, a divergência genética expressa a diferença entre as frequências alélicas das populações. Portanto, é a diferença entre as contrapartes alélicas que dará origem à divergência genética (BORÉM, 2001).

Protocolos na otimização da extração de DNA – Estudos básicos sobre metodologias específicas que possam otimizar extrações de DNA de boa qualidade, são de grande importância para que regiões desejadas sejam localizadas e amplificadas, e garantir sucesso em trabalhos científicos no campo da biologia molecular (SOLLÉRO *et al.*, 2004).

Existem na literatura vários protocolos para extração de DNA genômico a partir de material armazenado em EDTA ou álcool, no entanto alguns são mais laboriosos enquanto outros mais simplificados (FUNGARO & VIEIRA, 2001). A obtenção de DNA genômico de boa qualidade é essencial para se obter bons resultados em experimentos, especialmente no uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nas quais os excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação (SAIKI, 1990; HOY, 1994). Independente do tipo de estudo molecular, as extrações de DNA devem apresentar um bom padrão de bandamento, com quantidade e qualidade suficientes para não causar interferências nos padrões de migração em géis de eletroforese (ROMANO & MIRANDA, 1999).

Isso indica a importância da utilização de novos protocolos que ainda necessitam ser testados para diferentes espécies aquáticas, com objetivo de desenvolver novas metodologias ou até mesmo aperfeiçoar as já existentes no intuito de otimizar o tempo de trabalho e a eficiência dos resultados.

Neste estudo foram testados diferentes protocolos para extração de DNA utilizando três tecidos distintos bem como foi realizado a caracterização genética do *L. synagris*, o ariacó, comercializados nas cidades de Valença – BA e Fortaleza – CE, por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR, com o objetivo de caracterização genética e análise de variação genética nas populações estudadas gerando subsídios que passam auxiliar em um planejamento da pesca e uso sustentável dos recursos pesqueiros.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi testar diferentes protocolos para extração de DNA em tecidos de interesse e caracterizar duas populações do ariacó, *Lutjanus synagris*, através de marcadores ISSR, gerando informações para programas de conservação do patrimônio genético da espécie a fim de fornecer subsídios na elaboração de propostas que auxiliem no planejamento sustentável da captura dos recursos pesqueiros.

4.2 Objetivos específicos

Elaboração de um banco genético “in vitro” de exemplares da espécie, *Lutjanus synagris*, provenientes da captura comercial do estado do Ceará e Bahia;

Caracterizar através de marcadores ISSR indivíduos da espécie e *L. synagris* amostrados em dois pontos da costa do Nordeste;

Estimar a diversidade genética de duas populações de *L. synagris* por meio de marcadores moleculares ISSR;

Avaliar os níveis de variações genéticas entre e dentro das populações de *L. synagris*;

Testar protocolos para extração de DNA, em busca de uma amostra de melhor qualidade.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados 60 indivíduos da espécie *L. synagris*, sendo 30 amostras oriundas da captura comerciais na região de Valença - BA e comercializadas no mercado municipal da mesma cidade e 30 indivíduos

oriundos de Fortaleza – CE, comercializados no mercado de peixe do Mucuripe. As amostragens foram bimestrais durante os meses de março de 2011 até meados de abril de 2012. No laboratório, os espécimes foram identificados ao nível de espécie segundo a chave de identificação de Menezes & Figueiredo (1980). Amostras de aproximadamente 200-300 mg de músculo, fígado e coração dos espécimes coletados foram retiradas. No laboratório do Núcleo de Estudo em Pesca e Aquicultura (NEPA), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, campus Cruz das Almas, o material amostrado foi armazenado em etanol 95% (para fixação) e preservados a -20°C (Figura 7), para posteriormente dar procedimento ao processo de extração de DNA.

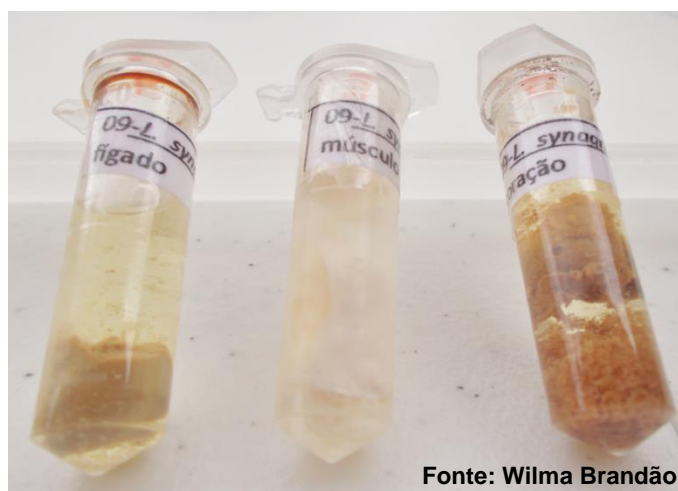


Figura 7: Armazenamento em álcool a 95% das amostras de diferentes tecidos do espécime de *L. synagris*. Da esquerda para a direita amostra de fígado, músculo e coração.

5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram realizados testes com dois protocolos de extração (Fenol - Clorofórmio e Acetato de Amônio), em busca de um DNA mais íntegro e sem resíduos. Utilizando-se três tipos de tecidos (músculo, fígado e coração).

O Protocolo Fenol – Clorofórmio, descrito por Sambrook et al. (1989), necessita de mais tempo para ser realizado, sendo utilizadas para a purificação do DNA as substâncias fenol e clorofórmio, consideradas tóxicas para o

organismo humano. As amostras foram colocadas em microtubos, e em seguida, adicionados 500 μ L de tampão de lise (4 μ l de Tris- Cl 1M pH 8,0, 160 μ l de EDTA 0,25M, 20 μ l de SDS 10%400mM e 216 μ l de água destilada;), podendo acrescentar RNase no processo(sendo opcional). Após a maceração e adição do tampão foi deixado em estufa a 37°C durante 1 hora para total evaporação do álcool. Posteriormente foram adicionados 3 μ l de Proteinase K (200 μ g/ml) e levados em banho-maria a 37°C, onde permaneceram entre 24 à 48 horas (no caso de músculo ou vísceras)) até ficar bem dissolvido. Após esse tempo, foi colocado um volume de Fenol correspondente a 400 μ l, agitado por 15 minutos e em seguida centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos, no segundo momento foi retirado 350 μ l do sobrenadante e preservado em outro tubo eppendorf sendo acrescentado um volume de Fenol correspondente a 350 μ l, agitado por 15 minutos e centrifugado por 5 minutos a 6.000 rpm; foi retirado 300 μ do sobrenadante e preservado novamente em outro tubo eppendorf. Adicionou – se 300 μ l de Álcool isoamílico-clorofórmio (1:24), agitado durante 15 minutos e centrifugado durante 10 minutos a 6.000 rpm retirando e conservando 250 μ l do sobrenadante e colocado em outro tubo eppendorf, adicionando 10% do volume final de NaCl e agitando cuidadosamente. O Etanol absoluto gelado foi colocado num volume correspondente a 2,5 x do total que ficou no tubo e agitado levemente e levado a Centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos. Foi retirado o álcool absoluto com cuidado para que não descartasse o *pellet* de DNA e adicionando – se aproximadamente 1000 μ l de álcool 70%(para que o DNA fosse novamente hidratado). O material foi colocado novamente na centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos e, após o termino da centrifugação foi descartado o álcool 70% e posicionados os tubinhos num suporte deitados ou inclinados para que o álcool evaporasse totalmente, deixando secar *over night*,

No dia seguinte o material foi diluído em 100 μ l de solução tampão TE 1M pH 8,0 e deixado em banho-maria 37°C por 20 minutos. Em alguns casos foi acrescentado RNase (para limpeza da extração) e levado á estufa por 1 hora e estocado o material sob refrigeração à -20°C. No dia seguinte a qualidade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1,0%.

O Protocolo acetato de amônia é uma alternativa simples, fácil, rápida e menos contaminante ao organismo humano para a obtenção de DNA de boa qualidade em quantidades suficientes para uso. Amostras de tecido de peixes foram colocadas em microtubos e adicionado 550 μ L de tampão de lise (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 100mM EDTA), contendo 2% SDS e 5 μ L de 200 μ g.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 37°C overnight, até que o tecido esteja completamente diluído. No dia seguinte, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e adicionadas 300 μ L de acetato de amônia a cada amostra, em seguida levadas ao vortex e incubadas no gelo por 30 minutos, antes de serem centrifugadas por 10 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos sendo o DNA precipitado com 300 μ L de etanol absoluto gelado e invertido os microtubos gentilmente e acondicionadas a -20°C overnight para ajudar na precipitação. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm sendo descartado o sobrenadante, adicionado 600 μ L de etanol 70% para lavagem, após isso o material foi centrifugado novamente por 10 minutos a 13.000 rpm e descartado o etanol cuidadosamente. Em seguida, os microtubos foram invertidos em papel absorvente para secagem do pellet a temperatura ambiente *over night* ou colocados na estufa por 30 minutos. No dia seguinte as amostras de DNA foram ressuspensas com 50 μ L ou 100 μ L em tampão TE (10mM de Tris pH 8,0 e 0,1mM de EDTA), e incubadas em banho-maria durante 40 minutos a 37°C. O DNA obtido foi estocado a -20°C.

5.2 Reações de amplificação do DNA via PCR

Quantificação de DNA em Gel de Agarose – Após finalizar os procedimentos de extração de ácidos nucléicos foi verificada a quantidade de DNA obtida. A quantificação do DNA extraído foi realizada através do sistema gel de agarose (1%) por eletroforese com brometo de etídio (1,5 μ l) e corante marcador, azul de bromofenol (3 μ l) e diluído o marcador λ com peso molecular de 100, 50 e 25 pares de bases, para indicar a quantidade de DNA para sua posterior diluição de trabalho. O gel foi posto numa cuba eletrolítica sob 70 Volts e amperagem de 500v durante 30 minutos. Decorrente a corrida, a foto

do gel foi registrada no transluminador UV, através do sistema de fotodocumentação L-PIX Loccus Biotecnologia - Molecular Imaging. A concentração de DNA foi estimada visualmente e quantificada no programa Excel com dados fixos e valores ($\text{ng}/\mu\text{l}$) que se ajustavam mediante a quantificação visual e depois novamente re-quantificado para verificar o pareamento das bandas.

Amplificação do DNA via ISSR – A concentração e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas em gel de agarose 2,0%. Os padrões de amplificação de fragmentos de DNA flanqueados por seqüências repetitivas foram obtidos através do emprego da técnica de ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), proposta por Gupta et al., 1994. Nessa técnica o DNA total foi submetido à PCR, empregando-se *primers* tetranucleotídicos de seqüência repetitiva simples, o qual foi selecionado a partir de testes preliminares com um total de oito *primers* diferentes, a saber: $(\text{TAGG})_4$, $(\text{GGAC})_4$, $(\text{GACA})_4$, $(\text{GGAT})_4$, $(\text{AAGC})_4$, $(\text{CACT})_4$, $(\text{GGGT})_4$, e $(\text{AACC})_4$ de acordo com a ilustração das tabelas 1 e 2. A técnica discutida não foi até o momento aplicada em espécies do gênero *Lutjanus*. De todos os iniciadores de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) testados, dois $(\text{GGAC})_4$ e $(\text{GACA})_4$ demonstraram boa resolução os quais foram selecionados para análises. 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 2 e 3. O mix de PCR (30 μL) para análise de ISSR foi composto por 2,0 ng de DNA genômico, 4,0 μl mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 4,0 μl de MgCl_2 , 0,8 mM de cada dNTPs, 0,3 μM do iniciador e 0,2 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 60V por 3 horas. Após a corrida, os géis foram visualizados e gravados em equipamento L-PIX Loccus Biotecnologia - Molecular Imaging.

Tabela 1. Programa de amplificação do DNA para o *primer* (GGAC)₄.

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	1 minuto	39
Anelamento	55 °C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	1
Resfriamento	14°C	Indeterminado	--

Tabela 2. Programa de amplificação do DNA para o *primer* (GACA)₄.

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	1 minuto	39
Anelamento	48 °C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	1
Resfriamento	14°C	Indeterminado	--

5.3 Análise estatística dos dados

As bandas de ISSR reprodutíveis foram avaliadas como ausente (0) ou presente (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 pelos métodos de UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Sneath e Sokal, 1973).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo acetato de amônia apresentou visualmente a melhor qualidade e quantidade de DNA extraído, sem degradação e contaminação por proteína (Figura 8). O protocolo Fenol - Clorofórmio apresentou quantidade satisfatória de DNA, mas continha visualmente quantidades significativas de rastro (Figura 9). Para Parpinelli e Ribeiro (2009), em uma boa extração apenas uma banda íntegra deve aparecer, pois rastros podem indicar degradação do DNA ou excesso de proteína, e outras bandas a presença de RNA.

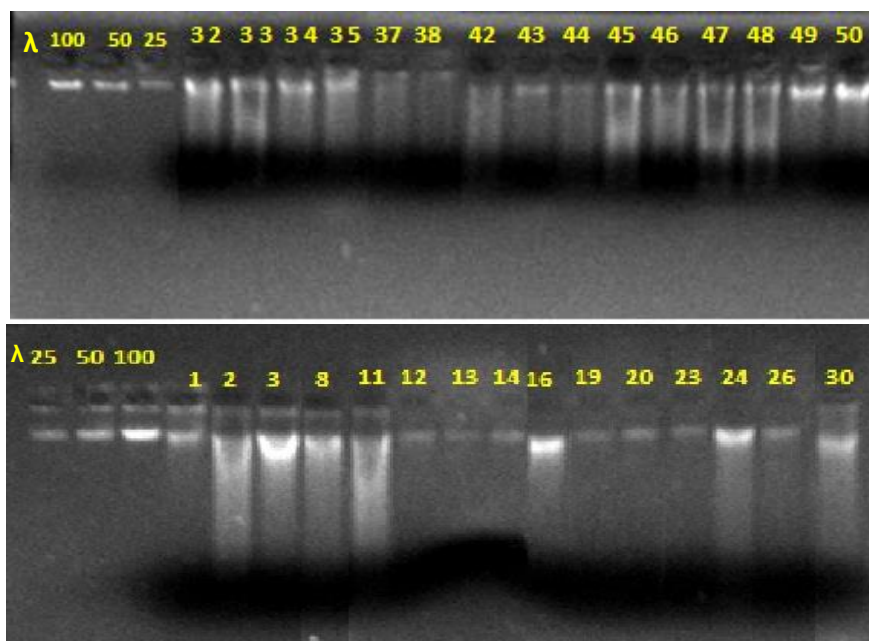


Figura 8 – Produto da extração de DNA utilizando o protocolo de acetato de amônia nas amostras de *Lutjanus synagris*. λ (marcador de peso molecular de 100, 50 e 25 pares de bases).

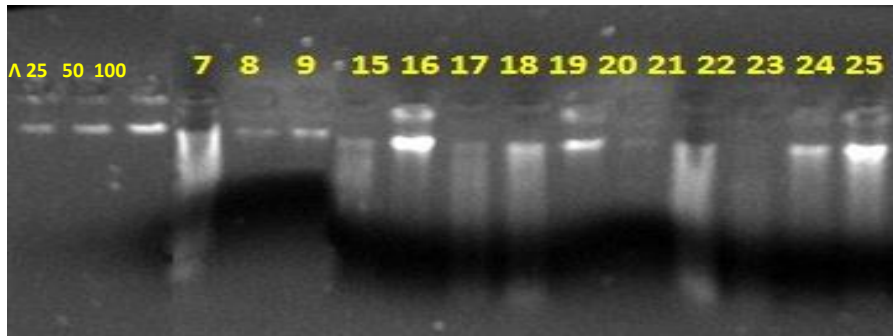


Figura 9 – Produto da extração de DNA utilizando o protocolo Fenol - Clorofórmio, nas amostras da *Lutjanus synagris*. λ (marcador de peso molecular de 100, 50 e 25 pares de bases).

Nas figuras acima podemos observar a diferença entre as extrações de DNA a partir de tecido de músculo, para os dois protocolos (Fenol – Clorofórmio e acetato de amônia). Sendo que o tecido, no protocolo de acetato de amônia possibilitou visualmente melhor qualidade e quantidade de DNA extraído, deixando pouco rastro por degradação e contaminação por proteína. As amostras de fígado e coração se apresentaram com muito rastro de degradação de DNA e quantidades significativamente grande de proteína. As amostras de fígado e coração se apresentaram com muito rastro de degradação de DNA e quantidades significativamente grande de proteína (Figura 10), corroborando que o tecido muscular foi o melhor para obter uma maior quantidade de DNA em comparação aos demais tecidos e com o protocolo de extração de Fenol.

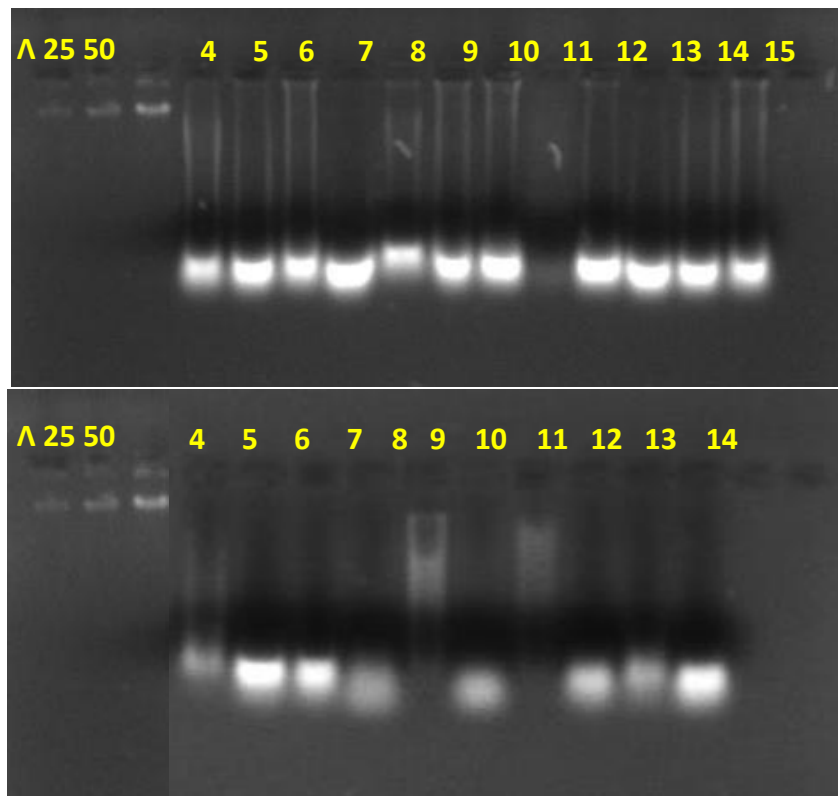


Figura 10 – Produto da extração de DNA utilizando o protocolo acetato de amônia nos tecidos fígado (a) e coração (b), nas amostras da *Lutjanus synagris*. λ (marcador de peso molecular de 100, 50 e 25 pares de bases).

A identificação das espécies bem como a caracterização genética são cruciais para programas de conservação, manejo e melhoramento. É também um pré-requisito essencial para estudos de populações. Frequentemente, a caracterização genética é feita com base em marcadores fenotípicos. Contudo, estes são limitados em números e muito influenciados pelo ambiente. Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies e caracterizar genótipos, independente do estágio de vida do animal e são neutros, ou seja, não sofrem influência ambiental (Fergunsom *et al.*, 1995).

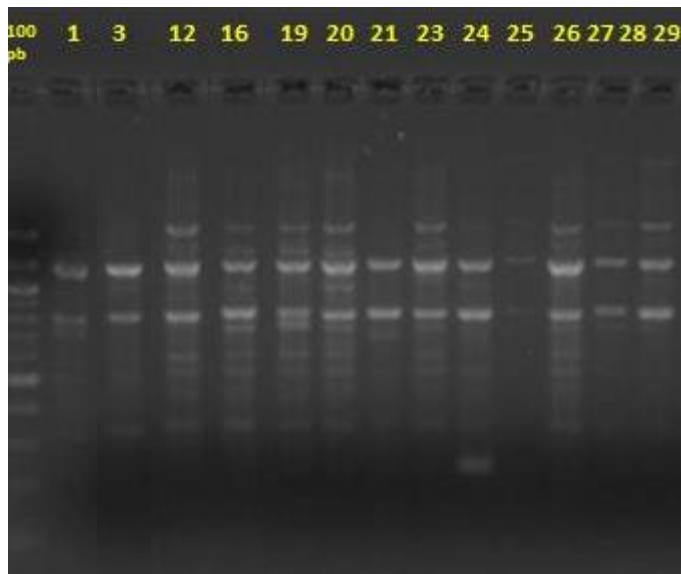


Figura 11 – Produto da amplificação do DNA pela PCR utilizado o *primer* (GGAC)₄,utilizando Ladder de 100 pares de base(pb), em espécie *Lutjanus synagris*

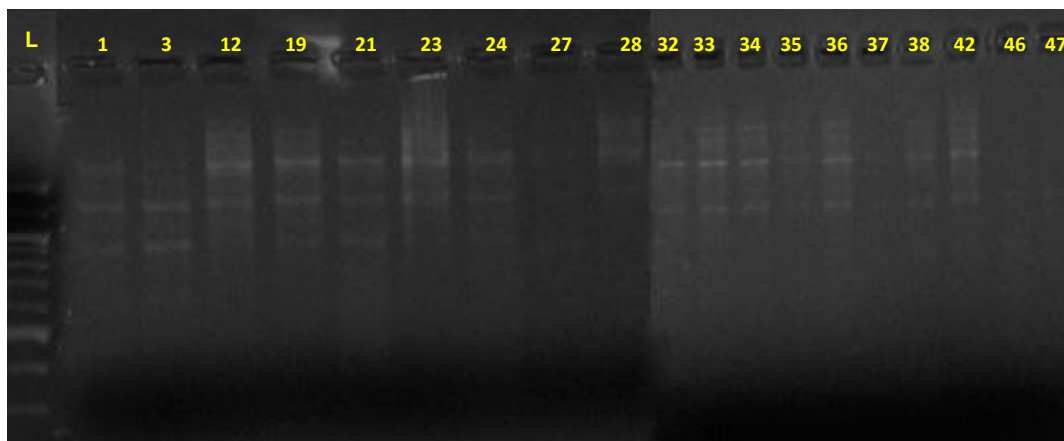
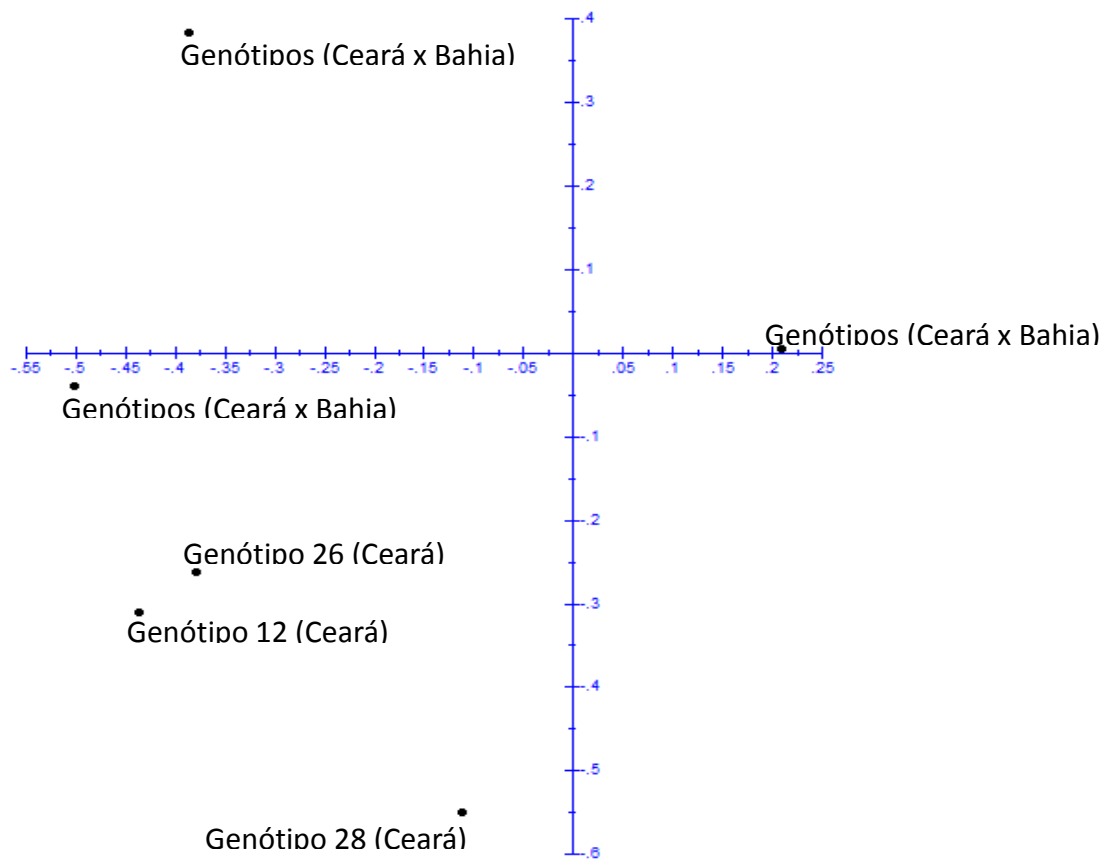


Figura 12 – Produto da amplificação do DNA pela PCR utilizado o *primer* (GACA)₄,utilizando Ladder de 100 pares de base(pb), em espécie *Lutjanus synagris*.

No presente trabalho, os dois iniciadores ISSR utilizados permitiram a distinção dos genótipos estudados e foram satisfatórios para a detecção de polimorfismo em *Lutjanus synagris* (Figura 11 e 12), demonstrando a eficiência da utilização de marcadores moleculares na caracterização genética em peixes. Tessier *et al.* (1995) identificaram alto grau de diferenciação genética em populações de salmão do Atlântico com marcadores de microssatélites, em

que análises de isoenzimas e de DNAm_t haviam falhado em revelar tal estruturação em salmão do Atlântico Norte. Reprodutores de carpa comum na Hungria foram analisados geneticamente utilizando microssatélites e RAPDs (Bártifai, *et al.*, 2003). Os autores chegaram à conclusão de que as análises feitas por marcadores microssatélites revelaram informações mais detalhadas sobre a diversidade genética dos animais do que os marcadores RAPD.

A análise de agrupamento de marcadores ISSR (correspondência múltipla) revelou a presença de 3 genótipos distintos oriundos do Ceará. Os demais genótipos se agruparam mesmo em locais diferentes (Ceará e Bahia) indicando que os mesmos compartilham de alelos em comum. Uma provável explicação também está associada ao fluxo gênico entre estes indivíduos. Esta espécie além de se distribuir através dos trópicos, desde o Oceano Atlântico Ocidental, a partir do estado norte americano da Carolina do Norte, até o estado de São Paulo no Brasil (CARVALHO-FILHO, 1999) vem também apresentando extensa migração reprodutiva, para áreas onde há formações de corais oceânicos, principalmente em semanas onde ocorrem fases de luas cheias (CUMMINGS, 2007). Esse fato possibilitou a troca de alelos em comum revelando um baixo fluxo gênico nas populações amostradas. A distribuição dos 49 genótipos nos planos fatoriais (1, 2, 3) é apresentada na Figura 13. Cada um dos três primeiros eixos explica uma parte limitada da variabilidade total: 26,85%, 17,62%, e 8,4% para os eixos X, Y e Z, respectivamente.



1/2

Figura 13. Coordenadas principais eixos 1/2 de 49 genótipos de espécie *Lutjanus synagris* baseado em marcadores ISSR.

A análise de agrupamento efetuada com os genótipos de *Lutjanus synagris* com base em marcadores ISSR permitiu visualizar a proximidade dos genótipos oriundos do Ceará e Bahia (Figura 14).

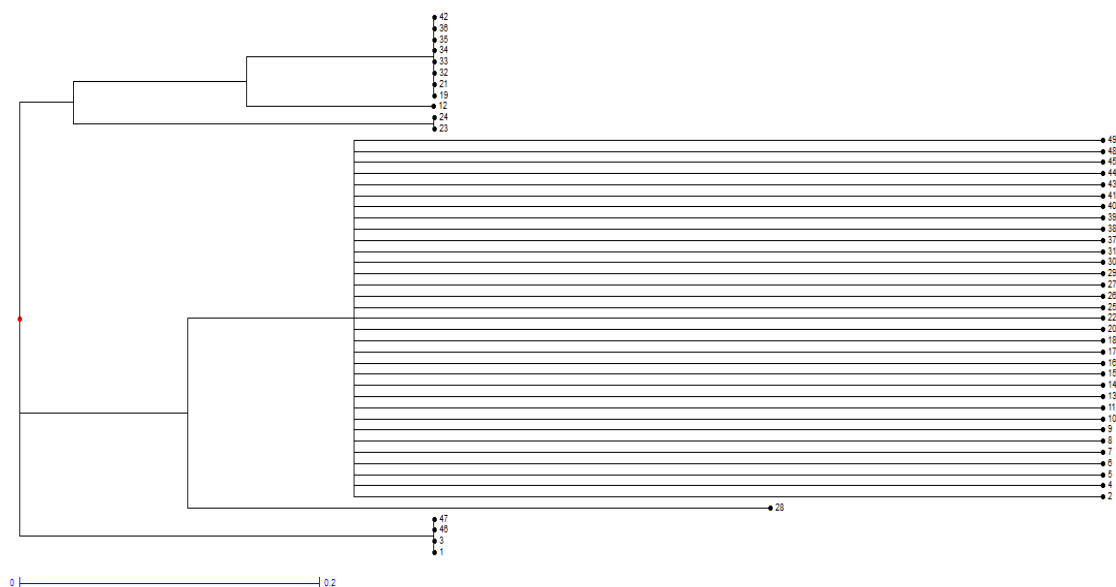


Figura 14. Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) baseado em marcadores ISSR de 49 genótipos de *Lutjanus synagris*.

Apesar dos genótipos serem oriundos de localidades distantes (Ceará e Bahia), houve pouca diferenciação entre os mesmos, indicando que boa parte dos genótipos compartilham de alelos em comum, conseqüentemente possuem trechos de DNA que codificam para um mesmo gene ou genes cujas características são comuns a maioria dos genótipos estudados. No entanto, evidencia-se a natureza dominante do marcador ISSR tornando limitada a indicação dos indivíduos heterozigotos.

9. CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível montar um banco genético “in vitro” de DNA preservado em álcool com 60 exemplares coletados das cidades de Valença – BA e Fortaleza – CE.

Os dois protocolos utilizados possuem validade para a extração do DNA total de tecido de *Lutjanus synagris*, sendo o protocolo de acetato de amônia, uma alternativa mais rápida, de baixo custo e não contaminante, eficiente para extração de DNA e análises de marcadores moleculares no gênero *L. synagris*.

Dentre os tecidos utilizados, o músculo possibilitou visualmente melhor qualidade e quantidade de DNA extraído, sem degradação, rastro e/ou contaminação por proteína.

Neste trabalho verificou-se que a técnica ISSR foi eficiente para a caracterização genética da espécie estudada, e possibilitou a obtenção de dados que evidenciaram a troca de alelos em comum revelando alto fluxo gênico para as duas populações de *Lutjanus synagris* amostradas no litoral dos estados do Ceará e Bahia.

Outro fator importante a considerar na pequena diversidade encontrada, foi a utilização de poucos primers ISSR tendo como consequência a baixa cobertura do genoma dos genótipos. Desta maneira, é essencial a continuação deste trabalho com um maior número de primers inclusive de natureza co-dominante, como microssatélites, em um maior número de genótipos

Referências Bibliográficas

- ACOSTA, A.; APPELDOORN, R. S. Estimation of growth, mortality and yield per recruit for *Lutjanus synagris* (LINNAEU) in Puerto Rico. **Bulletin of Marine Science**, [Miami], v. 50, n. 2, p. 282-291, 1992.
- 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.
- ALBERTO, J. P. N.; Perspectivas da Piscicultura Marinha no Nordeste do Brasil. **ABCC**, Fortaleza, ano XV nº1, p. 50-55, 2013
- ALEGRÍA, J. R.; MENEZES, M. F. de. Edad y crecimiento del ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en el Nordeste del Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 10, n. 1, p. 64-68, 1970.
- 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. **Ci. Biol. Saúde**, v. 9, n. 2, p. 7-15. 2003.
- BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; KOVACS, B.; URBANYI, B.; TAMAS, G.; HORVATH, L.; ORBAN, L. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture**, v.219, p.157-167, 2003.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and *Arabidopsis thaliana*. **Hereditas**, v.140, p.245-248, 2004.
- CARIA, F. **Aspectos da dinâmica reprodutiva do Ariacó *Lutjanus synagris* (Pisces:Lutjanidae) no litoral de Salvador e adjacências**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2000.
- CARVALHO-FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. 3 ed. São Paulo: Melro, 1999.
- CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. 2 ed. Caracas: 1993.
- COLEMAM, F. C.; KOENIG, C. C.; HUNTSMAN, G. A.; MUSICK, J. A.; EKLUND, A. M.; MCGOVERN, J. C.; CHAPMAN, R. W.; SEDBERRY, G. R.; GRIMES, C. B. **Long-lived Reef Fishes: The Grouper Snapper Complex**, 2000.
- COLEMAN, F. C.; KOENING, C.C.; EKLUND, A. M.; GRIMES, C. **Management and conservation of temperate reef fishes in the grouper-snapper complex of the southeastern United States**. In: MUSICK, J.A. (Ed.) Life in the slow lane: ecology and conservation of long-lived marine animals. Am. Fish. Soc. Symp. 23. p.233–242. 1999.

CUMMINGS, N.; MATOS-CARABALLO, D. **Information on Commercial Removals of the Mutton snapper, *Lutjanus analis*, in Puerto Rico from 1983 through 2005 and trends in nominal catch per unit of effort.** SEDAR 14 Data Workshop Rpt. No. 7 and US DOC,NMFS, SEFSC, SFD Doc. No.16. 40p. 2007.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **J Fish Biol**, v.47, p.103-126, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).

FISHER, W. FAO. **Species Identification Sheets for Fishery Purposes.** Western Central Atlantic Fishing Area 31. Fishery Resources and Environment Division. FAO, Rome. 1978.

FONTELES-FILHO A.A. Estudo da idade e crescimento do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey (Pisces: Lutjanidae), no Norte e Nordeste do Brasil. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza. v.27, p.69-81, 1988.

FONTELES-FILHO, A. A. Estudo preliminar sobre a pesca do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey, no Nordeste brasileiro. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v. 9, n.1, p 83-88, 1969.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAO Species Catalogue. Snappers of the World: an annotated and illustrated catalogue of lutjanids species known to date. Rome: FAO, 1985, 208 p. Volume 6.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. **Marcadores moleculares.** In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; DE AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001, p.153-199.

GESTEIRA, T. C. V.; ROCHA, C. A. S. Estudo sobre a fecundidade do ariocó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), da costa do Ceará (Brasil). **Arq. Ciên. Mar**, v.16, v.1, p.19-22, 1976.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications.** Oxford University Press, New York. 1999.

IBAMA. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Nordeste do Brasil – 1999.** Centro de Pesquisa e Gestão dos recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste – 1999, 150 p., Tamandaré, CEPENE, 2000.

IBAMA. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Nordeste do Brasil – 2002.** Centro de Pesquisa e Gestão dos recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste – 2002, 209 p., Tamandaré, CEPENE, 2003.

IBAMA. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Nordeste do Brasil – 2005**. Centro de Pesquisa e Gestão dos recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste – 2005, 217 p., Tamandaré, CEPENE, 2007.

IUCN. 2000. **The IUCN Red List of Threatened species**. Available on at www.iucn.org.

IVO, C.T.C.; SOUSA, M.J.B. Sinopse de informações sobre o pargo, *Lutjanus purpureus* Poey (Pisces:Lutjanidae), no Norte e Nordeste do Brasil. **Arq. Ciên.Mar**, Fortaleza, v. 27, p. 57-67, 1988.

LEWONTIN, R. **The apportionment of human diversity**. In: DOBZHANSKY, T.; HECHT, M. K.; STEERE, W. C. (Ed.). *Evolutionary Biology*. New York: Appleton-Century- Crofts. 1972. p.381-398.

LIMA, W. B., Idade e crescimento do ariacó, *Lutjanus synagris*, da costa norte da Bahia. (Monografia) – Programa de graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004

MACHADO, L. F.; BERTONCINI, A. A.; HOSTIM–SILVA, M.; BARREIROS, J. P. Habitat use by the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and its relative abundance, in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v.6, n.4, p.133-138, 2003.

MAGALHÃES, S.R.; 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 do CEPENE**, v.11, n.1, p.35-44, 2003.

McMANUS, J. W. Modelling the effects of destructive fishing practices on tropical coral reefs. **Marine Ecology Programming Series**, v.94, p.51-60, 1993.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes do Sudeste do Brasil**. São Paulo, 1980. p. 96.

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. 1970. 93p.

NELSON, J. **Fishes of the World**. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York. 2006. p. 523.

PADILHA, L. et al. Microsatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2002, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, 2002.

PARPINELLI, R.S.; RIBEIRO, R.P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 22-33, 2009.

PAULY, D.; CHRISTENSEN, V.; DALSGAARD, J.; FROESE, R.; TORRES, F. Jr. **Fishing Down Marine Food Webs. Science**, 1998, v.279, p.860-863, 1998.

POLOVINA, J.J.; RALSTON, S. **Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management**. Westview Press, Oceans Resources and Marine Policy Series, 659 p., 1987

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C.R. Microsatellite and Kinship. **Tree**, v.8, n.8, p.285-288, 1993.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simplesequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.

REZENDE, A. 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. **Bol. Técn. Cient. CEPENE**, v.11, n.1, p.257-270, 2003.

ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

SAIKI, R. K. **Amplification of genomic DNA**. In: IINNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKI, J. J.; WHITE, T. J (Ed.). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p.13-20.

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

SMITHSONIAN MARINE STATION AT FORT PIERCE. **The Indian River Lagoon Species Inventory**. Florida, 2010. Disponível em http://www.sms.si.edu/irlspec/lutjan_synagr.htm. Acesso em 10 dez. 2012.

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

SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM.

SOUZA R.F.C. **Relatório da Reunião Técnica sobre o estado da Arte da Pesca de Pargo no Norte e Nordeste do Brasil**. GPEdoPargo, IBAMA, 2000.

TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; PRESA, P.; ANGERS, B. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. **J Fish Biol**, v.47, suppl. A, p.156-163, 1995.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, Lawrence, v.38, p.1358-1370, 1984.

WUNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, v. 125, p. 59-67, 2002.

XIMENES M.O.C.; FONTELES-FILHO A.A. Estudo da idade e crescimento do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey (Pisces: Lutjanidae), no Norte e Nordeste do Brasil. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v.27, p.69-81, 1988.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymorphism chain reaction amplification. **Genomics**, Amsterdam, v. 20, p. 176-183, 1994.