



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AQUÁTICOS
TROPICAIS**



INAJARA MARQUES BEZERRA OLIVEIRA

**CONECTIVIDADE GENÉTICA DE *SCARUS TRISPINOSUS*
(VALENCIENNES, 1840) AO LONGO DE SUA DISTRIBUIÇÃO
GEOGRÁFICA**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
2017**

INAJARA MARQUES BEZERRA OLIVEIRA

**CONECTIVIDADE GENÉTICA DE *SCARUS TRISPINOSUS*
(VALENCIENNES, 1840) AO LONGO DE SUA DISTRIBUIÇÃO
GEOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais (PPGSAT) da Universidade Estadual de Santa Cruz, como preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Sistemas Aquáticos Tropicais

Orientadora: Fabiana César Félix Hackradt

Co-Orientadora: Karina Peres Gramacho

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
2017**

O48

Oliveira, Inajara Marques Bezerra.

Conectividade genética de *Scarus Trispinosus* (Valenciennes, 1840) ao longo de sua distribuição geográfica (Bahia) / Inajara Marques Bezerra Oliveira. – Ilhéus, BA: UESC, 2017.

54 f. : il.

Orientadora: Fabiana César Félix Hackradt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais.

Inclui referências.

1. Peixes – Populações. 2. Recursos pesqueiros – Administração. 3. Microssatélites (Genética). 4. Recursos marinhos – Conservação. I. Título.

CDD 597

“Toda nossa ciência comparada com a realidade é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

“So I will call upon Your name
And keep my eyes above the waves
When oceans rise
My soul will rest in Your embrace”

Hillsong United

AGRADECIMENTOS

SEMPRE em primeiro lugar na minha vida, agradeço a Deus, por sua infinita graça e misericórdia comigo. Meu coração descansa em Ti.

Agradeço a minha família (Mãe, Ubiara e Tai) por me apoiarem sempre e por ser minha maior e mais verdadeira torcida.

Ao meu amor e parceiro da vida (Du), você mais do que ninguém sabe como é difícil o dia a dia com uma pessoa “surtando” com a dissertação. Obrigada pelo colo, encorajamento, amor e compreensão. Mais quatro anos de luta virão, prepare-se!!

À Fabiana, por ser uma orientadora acessível, paciente e acima de tudo, disponível. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos e me fazer crescer como profissional.

À Karina, que me recebeu e apresentou o encantador mundo da genética e contribuiu imensamente com esse trabalho.

À Mariana Barreto, meu braço esquerdo e direito. Não sei como teria sido minha vida no laboratório sem o seu auxílio, mas com certeza teria sido muito mais confusa e difícil. “A menina do peixe” será eternamente grata.

Aos amigos que eu fiz no Fitomol (Aline, Analine, Alezânia, Seu Luiz, Ailton, Seu Rubens, Mylena, Renato, Ivanna, Elizabeth, Rafaela Andrade, Nara) vocês eram a minha alegria quando tudo dava errado!! Vocês estarão sempre no meu coração. Obrigada pelo incentivo, empurrão nos dias em que estamos frustrados e por não me deixar desanimar.

Aos professores que estiveram presentes nas bancas dos seminários e qualificação, e que contribuíram grandemente para a construção de nossas ideias: Carlos Hackradt, Pedro Melo, Yvonick Le Pendu e Leonardo Moraes.

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) pelo acolhimento e parceria.

À Prof. Dra. Beatrice Padovani pelas amostras de Pernambuco.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

CAPITULO 1 - Amplificação cruzada de 17 locos microssatélites de *Scarus rubroviolaceus* (Bleeker, 1847) para quatro espécies de peixes da família labridae 16

1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Locais de coleta e procedimentos laboratoriais	19
2.2 Análises estatísticas.....	21
3. RESULTADOS.....	21
4. DISCUSSÃO	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

CAPÍTULO 2 - Diversidade genética e fluxo gênico em uma espécie endêmica ameaçada da costa brasileira, *Scarus trispinosus* (Valenciennes, 1840)..... 28

1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Área de Estudo.....	33
2.2 Amostragem e extração de DNA	34
2.3 Amplificação e Genotipagem.....	34
2.4 Análise de dados	35
3. RESULTADOS.....	37
3.1 Variabilidade Genética	37
3.2 Estrutura populacional	39
4. DISCUSSÃO	42
5. REFERÊNCIAS	46
6. CONCLUSÕES GERAIS	55

RESUMO

O entendimento da estrutura populacional assim como a compreensão de suas relações evolutivas, é o objetivo principal dos estudos genéticos, principalmente quando buscam à conservação das espécies. Marcadores do tipo microssatélites são caracterizados por apresentarem elevado polimorfismo, por serem codominantes e por estarem amplamente distribuídos ao longo do genoma, sendo que vários locos independentes podem ser eficientemente combinados durante o processo de genotipagem. No grupo dos peixes, o uso desse marcador tem se mostrado bastante eficaz em estudos de história populacional e conectividade genética, revelando como a dispersão une as populações mesmo em longas distâncias. O aumento nas capturas de peixes papagaios, assim como de outros grandes herbívoros nas últimas décadas pode reduzir a capacidade de resistência e resiliência dos ecossistemas coralíneos frente aos impactos antrópicos e naturais. Um total de 20 espécies de peixe-papagaio (Scarinae + Corinae) foi registrado no Atlântico Sudoeste, sendo o budião-azul (*Scarus trispinosus*) um dos mais importantes peixes herbívoros que habitam os recifes brasileiros. No capítulo 1, o presente trabalho objetivou testar o sucesso da amplificação cruzada de microssatélites desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus* em uma espécie endêmica e ameaçada, *Scarus trispinosus*. Adicionalmente neste mesmo capítulo acessamos a eficácia do procedimento para outras espécies da família Labridae e discutimos seu uso em trabalhos de ecologia da conservação. No capítulo 2, buscou-se avaliar a conectividade genética de *Scarus trispinosus* ao longo da sua área de distribuição buscando identificar os padrões de distribuição populacional e como fenômenos naturais e antrópicos podem afetar tais padrões. Além disso discutimos como os resultados encontrados podem auxiliar o manejo espacial desta espécie ameaçada de extinção

Palavras – chaves: Manejo pesqueiro, conservação, Budião azul, microssatélite

ABSTRACT

Understanding the population structure as well the understanding of its evolutionary relationships is the main objective of genetic studies, especially when searching for species conservation. Microsatellite markers are characterized by high polymorphism, codominance and widely distributed throughout the genome, and several independent loci can be efficiently combined during the genotyping process. In the fish group, the use of this marker has been shown to be quite effective in studies of population history and genetic connectivity, revealing how dispersion unites populations even over long distances. The increase in catches of parrotfish, as well as other large herbivores in the last decades, can reduce the resistance and resilience of coral reef ecosystems to anthropogenic and natural impacts. A total of 20 species of parrotfish (Scarinae + Corinae) were recorded in the Southwest Atlantic, being the green back parrotfish (*Scarus trispinosus*) one of the most important herbivorous fish inhabiting Brazilian reefs. In chapter 1, the present work aimed to test the success of cross - amplification of microsatellites developed for *Scarus rubroviolaceus* in an endemic and endangered species, *Scarus trispinosus*. Additionally, in this same chapter we access the procedure efficacy for other species of the Labridae family and discuss their use in conservation ecology works. In Chapter 2, we aimed to evaluate the genetic connectivity of *Scarus trispinosus* throughout its distribution area, seeking to identify the patterns of population distribution and how natural and anthropogenic phenomena can affect these patterns. In addition, we discuss how the results found may help the spatial management of this endangered species

Key - words: Fishery management, conservation, Green back parrotfish, microsatellite

INTRODUÇÃO GERAL

Diversos estudos já demonstraram como a ação das correntes oceânicas facilita a dispersão larval de peixes no ambiente marinho (Cowen et al., 2006 e 2007). Em função dessa homogeneização, é esperado que essas populações apresentem baixas taxas de mudanças evolutivas ao longo do tempo (Hauser; Carvalho, 2008), o que é comprovado em diversos estudos onde foram avaliados a estrutura genética entre espécies de peixes que são estreitamente relacionadas ou geograficamente distantes (Silva et al., 2015; Souza et al., 2015).

Nesse contexto, o entendimento da estrutura populacional somado as relações evolutivas entre as espécies se mostra de extrema importância principalmente quando esses estudos buscam à conservação da biodiversidade (Avila-Diaz; Oyama, 2007). Portanto, analisar os padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação intra-específico é de fundamental importância para a definição de estratégias de manejo e uso sustentável dos recursos ambientais (Gribel, 2001).

O surgimento dos marcadores moleculares somado ao desenvolvimento da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase) foram os precursores na identificação de bancos genéticos de peixes (Sykes, 2003). Assim, os marcadores moleculares passaram a ser amplamente utilizados para avaliar a diversidade genética e esclarecer relações filogenéticas e demográficas das populações, principalmente no que se refere ao entendimento da história evolutiva das espécies (Awise, 1994, 2004). Existem diversos marcadores disponíveis para pesquisas nessa área, dentre estes destacam-se os marcadores microssatélite/SSRs (Simple Sequence Repeats – Sequências Simples Repetidas).

Marcadores do tipo microssatélites são caracterizados por apresentarem elevado polimorfismo, por serem codominantes e por estarem amplamente distribuídos ao longo do genoma, sendo que vários locos independentes podem ser eficientemente combinados durante o processo de genotipagem (Goldstein e Schlötterer, 1999). No grupo dos peixes, o uso desse marcador tem se mostrado bastante eficaz em estudos de história populacional e conectividade genética, revelando como a dispersão une as populações mesmo em longas distâncias (Bay et al., 2004; Bernardi et al., 2001; Bowen et al., 2001; Domingues et al., 2006, 2008; Garber et al., 2004; Puebla et al., 2009). Além disso, em diversos estudos, essa ferramenta foi utilizada para responder a

perguntas evolutivas e ecológicas referente ao número de populações, à origem de indivíduos, ao tamanho populacional efetivo e ao fluxo gênico (Selkoe e Toonen, 2006).

Uma das principais vantagens da utilização dos microsatélites é o fato de que estes podem ser obtidos a partir de diversos tipos de tecido (Nielsen et al., 2009), não sendo necessário o sacrifício do indivíduo, tornando assim, estes marcadores, ferramentas importantes em estudos de espécies que se encontram classificadas em algum tipo de ameaça de extinção.

Fatores como a sobrepesca têm levado à exploração dos recursos pesqueiros até o seu esgotamento, com a remoção tanto de peixes que estão em fase reprodutiva, como dos juvenis, o que impede que estes atinjam maturidade sexual e conseqüentemente limitando o potencial de recuperação natural dos estoques pesqueiros (Floeter et al., 2006). O aumento nas capturas de peixes papagaios, assim como de outros grandes herbívoros nas últimas décadas pode reduzir a capacidade de resistência e resiliência dos ecossistemas coralíneos frente aos impactos antrópicos e naturais (Aswani e Sabetian 2009, Fenner 2012), podendo ter efeito potencialmente intensificado devido à baixa redundância taxonômica desses grupos funcionais críticos (Moura et al., 2001). Tais fatores intensificam a necessidade de proteção em áreas onde existem recifes de corais (Pandolfi et al., 2003).

Um total de 20 espécies de peixe-papagaio (Scarinae + Corinae) foi registrado no Atlântico Sudoeste (Moura et al., 2001; Gasparini et al., 2003; Robertson et al., 2006), sendo o budião-azul (*Scarus trispinosus*) um dos mais importantes peixes herbívoros que habitam os recifes brasileiros (Francini-Filho e Moura 2008). Essa espécie tem papel-chave na proteção e sobrevivência dos corais, e, no entanto, nas últimas décadas tem sido capturado em crescentes intensidades (Previero et al., 2014). Adicionalmente, a maior parte da biomassa de peixes herbívoros de grande tamanho corporal no Banco dos Abrolhos pertence a uma espécie de Scarinae, o budião-azul (Francini-Filho e Moura 2008).

Tendo em vista a importância do conhecimento da diversidade genética intraespecífica, da ausência de trabalhos que utilizaram microsatélites em espécies da família Labridae, e da necessidade de conhecer as particularidades na distribuição populacional das espécies, em especial as espécies com algum grau de ameaça, que auxilie no estabelecimento de medidas legais para sua proteção, o presente trabalho objetivou: (i) testar o sucesso da amplificação cruzada de microsatélites desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus* em uma espécie endêmica e ameaçada, *Scarus trispinosus*, e

a eficácia do procedimento para outras espécies da família Labridae (Capítulo 1), discutindo o seu uso em trabalhos de ecologia da conservação. No capítulo 2 buscou-se avaliar a conectividade genética de *Scarus trispinosus* ao longo da sua área de distribuição. Neste capítulo buscamos identificar os padrões de distribuição populacional e como fenômenos naturais e antrópicos podem afetar tais padrões. Além disso discutimos como os resultados encontrados podem auxiliar o manejo espacial desta espécie ameaçada de extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aswani S., Sabetian A., 2009. Implications of Urbanization for Artisanal Parrotfish Fisheries in the Western Solomon Islands. *Conservation Biology*. 24 (2), 520–530.

Avila-Diaz, I., Oyama, K., 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94(2), 184 – 93.

Avise, J. C., 1994. A Speciation History of "Living Fossils": Molecular Evolutionary Patterns in Horseshoe Crabs. *Evolution*. 48(6).

Avise, J. C., 2004. Genetic sex determination, gender identification and pseudohermaphroditism in the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca: Melongenidae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271 (1539), 641 – 6.

Bay, L.K., Choat, J.H., van Herwerden, L., Robertson, D.R., 2004. High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past? *Marine Biology*. 144, 757–767.

Bernardi, G., Holbrook, S. J., Schmitt, R. J., 2001. Gene flow at three spatial scales in a coral reef fish, the three-spot dascyllus, *Dascyllus trimaculatus*. *Marine Biology*. 138 (3), 457 – 465.

Bowen, B. W., Bass, A. L., Rocha, L. A., Grant, W. S., Robertson, D. R., 2001. Phylogeography of the Trumpetfishes (*Aulostomus*): Ring species complex on a global scale. *Evolution*. 55(5), 1029 - 1039.

Cowen, R. K., Gawarkiewicz, G., Pineda, J., Thorrold, S. R., Werner, F. E., 2007. Population connectivity in marine systems. *Oceanography*. 20, 14 – 21.

Cowen, R. K., Paris, C. B., Srinivasan, A., 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*. 311, 522 – 527.

Domingues, V. S., Alexandrou, A., Almada, V. C., Bernardi, G., 2008. Tropical fishes in a temperate sea: Evolution of the wrasse *Thalassoma pavo* and the parrotfish *Sparisoma cretense* in the Mediterranean and the adjacent Macaronesian and Cape Verde Archipelagos. *Marine Biology*. 154 (3), 465 – 474.

Domingues, V. S., Santos, R. S., Brito, A., Almada, V. C., 2006. Historical population dynamics and demography of the eastern Atlantic pomacentrid *Chromis limbata* (Valenciennes, 1833). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40 (1), 139 – 147.

Fenner D., 2012. Challenges for Managing Fisheries on Diverse Coral Reefs. *Diversity*. 4:105 - 160.

Floeter, S. R., Halpern, B. S., Ferreira, C. E. L., 2006. Effects of fishing and protection on Brazilian reef fishes. *Biological Conservation*. 128, 391 - 402.

Francini-Filho, R.B., Moura, R.L., 2008. Dynamics of fish assemblages on coral reefs subjected to different management regimes in the Abrolhos Bank, eastern Brazil. *Aquatic Conservation and Marine and Freshwater Ecosystem*. 18, 1166-1179.

Garber, A. F., Tringali, M. D., Stuck, K. C., 2004. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic coast of Florida as determined from mitochondrial DNA control region sequence. *Marine Biotechnology*. 6, 175 – 185.

Gasparini, J. L., Joyeux, J. C., Floeter, S. R., 2003. *Sparisoma tuiupiranga*, a new species of parrotfish (Perciformes: Labroidae: Scaridae) from Brazil, with comments on the evolution of the genus. *Zootaxa*. 384.

Goldstein, D. B., Schlotterer, C., 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Gribel, R., 2001. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. Humanidades, Brasília/ DF. 48, 110-114.

Hauser, L. and Carvalho, G.R., 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*. 9, 333–362.

Leão Z. M. A. N., Dominguez JM. 2000. Tropical Coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 41, 112 - 122.

Moura, R. L., Figueiredo, J. L., Sazima, I., 2001. A new parrotfish (Scaridae) from Brazil, and revalidation of *Sparisoma amplum* (Ranzani, 1842), *Sparisoma frondosum* (Agassiz, 1831), *Sparisoma axillare* (Steindachner, 1878) and *Scarus trispinosus* Valenciennes, 1840. *Bulletin of Marine Science*. 68, 505-524.

Nielsen, E., Hemmer-Hansen, J., Larsen, P. F., Bekkevold, D., 2009. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. *Molecular ecology*. 18 (15), 3128 – 3150.

Pandolfi, J. M., Bradbury, R. H., Sala, E., Hughes, T. P., Bjorndal, K. A., Cooke, R. G., McArdle, D., McClenachan, L., Newman, M. J. H., Paredes, G., Warner, R. R., Jackson, J. B. C., 2003. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science*. 301(5635), 955 – 958.

Previero, M., 2014. A pesca do budião-azul (*Scarus trispinosus* Valenciennes, 1840) no maior complexo coralíneo do Atlântico Sul. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

Puebla, O., Bermingham, E., Guichard, F., 2009. Estimating dispersal from genetic isolation by distance in a coral reef fish (*Hypoplectrus puella*). *Ecology*. 90, 3087 – 3098.

Robertson, D. R., Karh, F., Moura, R. L., Victor, B. C., Bernardi, G., 2006. Mechanisms of speciation and faunal enrichment in Atlantic parrotfishes. *Molecular phylogenetics and evolution*. 40 (3), 795 – 807.

Selkoe, K. A., Toonen, R. J., 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9(5), 615 – 29.

Silva, R., Veneza, I., Sampaio, I., Araripe, J., Schneider, H., Gomes, G., 2015. High Levels of Genetic Connectivity among Populations of Yellowtail Snapper, *Ocyurus chrysurus* (Lutjanidae – Perciformes), in the Western South Atlantic Revealed through Multilocus Analysis. *PLoS ONE*. 10 (3).

Souza, A. S., Dias Júnior, E. A., Galetti Jr., P. M., Machado, E. G., Pichorim, M. e Molina, W. F., 2015. Wide-range genetic connectivity of Coney, *Cephalopholis fulva* (Epinephelidae), through oceanic islands and continental Brazilian coast. *Academia Brasileira de Ciência*. 87 (1).

Sykes, B., 2003. *As Sete Filhas de Eva. A ciência que revela nossa herança genética*. Rio de Janeiro: Record.

CAPITULO 1

AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE 17 LOCOS MICROSSATÉLITES DE *SCARUS RUBROVIOLACEUS* (BLEEKER, 1847) PARA QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA LABRIDAE.

RESUMO

Atualmente, o conhecimento e a conservação dos recursos genéticos são informações fundamentais para o manejo sustentável dos recursos pesqueiros. Neste sentido, os marcadores moleculares do tipo SSRs (Simple Sequence Repeat – Sequências Simples Repetidas) são ferramentas genéticas amplamente utilizadas em estudos voltados à conservação e manejo pelo seu potencial em reconhecer e caracterizar estoques populacionais, podendo, através disto, revelar populações-chaves para a conservação, identificar espécies crípticas, e entender a ação das mudanças ambientais sobre a variabilidade genética das espécies. O objetivo deste trabalho foi verificar a transferabilidade de 17 locos SSR desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus*, em quatro espécies, pertencentes à família Labridae: *Scarus trispinosus*, *Halichoeres brasiliensis*, *Sparisoma frondosum* e *Sparisoma axillare*, e verificar sua aplicabilidade em estudos ecológicos para as espécies brasileiras em questão. As amostras do tecido foram obtidas através de desembarques pesqueiros dos municípios de Porto Seguro e Coroa Vermelha, Bahia, entre os anos de 2015 e 2016. Dos 17 locos testados, observou-se amplificação bem-sucedida de cinco locos (29,4%) para *S. trispinosus*, 9 locos (52,9%) para *H. brasiliensis*, 13 locos para *S. frondosum* (76,4%), e 11 locos (64,7%) para *S. axillare*. O êxito da amplificação cruzada dos microssatélites confeccionados para a espécie *S. rubroviolaceus* foi menor entre as espécies do mesmo gênero em comparação as demais espécies. Adicionalmente foi encontrada homologia de três marcadores para as quatro espécies estudadas, podendo ser então utilizados como ferramenta de auxílio nos programas de conservação. Contudo, novos marcadores moleculares específicos devem ser desenvolvidos para *S. trispinosus*, para permitir um melhor entendimento sobre aspectos populacionais e sua relação de parentesco com as demais espécies da família.

Palavras-chave: Transferabilidade, SSR, Peixe papagaio, Conservação

CROSS AMPLIFICATION OF 17 MICROSATELLITE LOCI OF *SCARUS RUBROVIOLACEUS* (BLEEKER, 1847) FOR FOUR SPECIES OF FISH OF THE LABRIDAE FAMILY.

ABSTRACT

Knowledge and conservation of genetic resources are fundamental information for the sustainable management of fishery resources. In this sense, the molecular markers of the type SSRs (Simple Repeated Sequences) are genetic tools widely used in studies aimed at the conservation and management for their potential in recognizing and characterizing population stocks, which may reveal key populations for Conservation, identify species and to understand an action of the environmental changes on a genetic variability of the species. The aim of this work was to verify the transfer of 17 SSR loci developed for *Scarus rubroviolaceus* in four species belonging to the family Labridae: *Scarus trispinosus*, *Halichoeres brasiliensis*, *Sparisoma frondosum* and *Sparisoma axillare*, and its applicability in ecological studies for the Brazilian species in question. Tissue samples were obtained from fishery landings from the municipalities of Porto Seguro and Coroa Vermelha, Bahia (Brazil), between 2015 and 2016. From the 17 loci tested we observed a successful amplification of five loci (29.4%) for *S. trispinosus*, 9 loci (52.9%) for *H. brasiliensis*, 13 loci (76.4%) for *S. frondosum*, and 11 loci (64.7%) for *S. axillare*. The cross-amplification success of the microsatellites from *S. rubroviolaceus* was smaller between the species of the same genus in comparison with the other species. In addition, the homology of three markers was found for four species studied, and it can be used as tool in conservation programs. However, new molecular markers must to be developed for *S. trispinosus*, to allow a better understanding of the populations and their relationship with the other species of the family.

Key words: Transferability, SSR, Parrotfishes, Conservation

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento e a conservação dos recursos genéticos são cada vez mais apresentados como informações fundamentais para o manejo sustentável dos recursos pesqueiros (Bartley e Pullin, 1999). Neste sentido, os marcadores moleculares do tipo microssatélites são ferramentas genéticas amplamente utilizadas em estudos voltados à conservação e manejo pelo seu potencial em reconhecer e caracterizar estoques populacionais, podendo, através disto, revelar populações chaves para a conservação, reconhecer espécies independente de seu estágio de vida, e entender a ação das variações ambientais sobre a diversidade genética das espécies (Ryman e Utter, 1987).

Nesse contexto, os marcadores microssatélites destacam-se por serem de natureza co-dominante, multialélicos e por apresentarem alta reprodutibilidade. Além disso, a conservação dos sítios microssatélites ao longo do tempo torna possível a transferabilidade dos mesmos entre espécies ou gêneros relacionados evolutivamente (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Caixeta, 2006). Em numerosos estudos envolvendo a amplificação cruzada entre espécies, alguns iniciadores concebidos para uma espécie podem ser utilizados para amplificar locos ortólogos em espécies relacionadas (Moore et al., 1991; Primmer et al., 1996; Martinez Cruz et al., 2002). Estudos realizados com peixes tentaram a amplificação cruzada em espécies congêneres (Arigoni e Largiader, 2000, Guillemaud et al., 2000) ou confamiliares (Holmen et al., 2005) com sucesso variável. Esse fato ocorre, pois, o sucesso da amplificação cruzada é limitado segundo o grau de parentesco filogenético existente entre as espécies utilizadas, e novos marcadores microssatélites necessitam ser isolados para novas espécies.

Os peixes da família Labridae estão distribuídos em torno dos trópicos e foram originados durante o Mioceno-Oligoceno (entre 14-35 milhões de anos atrás) no mar tropical de Tethys. A diversificação deste grupo ocorreu antes e depois do fechamento do mar de Tethys e foi promovida por um número crescente de associações de habitat e modos diferentes de alimentação (Bellwood, 2001). Os primeiros peixes papagaios eram podadores que habitavam leitões de algas marinhas e passaram a se alimentar como raspadores e escavadores que habitavam substratos consolidados (Bellwood, 1994; Streelman et al., 2002). A família Labridae, representa um importante grupo funcional do sistema coralíneo pois contém em sua maioria espécies herbívoras capazes de controlar o crescimento das algas sobre os corais, contribuindo assim para o crescimento das colônias e capacidade do sistema em resistir a distúrbios (resiliência)

(Francini-Filho e Moura 2008). Revisões sistemáticas reclassificaram a família Scaridae (*Sparisoma* + *Scarus*) como sendo uma subfamília, Scarinae, dentro da família Labridae (Westneat e Alfaro, 2005).

O crescimento de peixes herbívoros como alvos da pesca é um exemplo do fenômeno “*Fishing down marine food webs*” (Pauly et al., 1998) que ocorre quando as principais espécies alvo vão sendo sistematicamente substituídas por outras de níveis tróficos inferiores (como os herbívoros). Essa mudança nos níveis tróficos ocorre principalmente em função da exaustão dos estoques das espécies tradicionalmente pescadas, como os lutjanídeos e epinephelídeos. Esse fenômeno também tem sido observado no Caribe devido ao aumento nas capturas de budiões nas últimas décadas, em decorrência da redução de espécies predadoras carnívoras (Fernández et al., 2011).

Vinte espécies de peixes dos gêneros estudados nesse trabalho habitam o litoral brasileiro, cinco do gênero *Sparisoma*, duas do gênero *Scarus* e onze do gênero *Halichoeres*. Todas as espécies utilizadas, com exceção de *Halichoeres brasiliensis*, estão inseridas na lista de espécies ameaçadas de extinção (Portaria MMA 445/14), o que reforça ainda mais a importância da realização de trabalhos que busquem compreender a ecologia dessas espécies.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a transferabilidade de 17 locos microsatélites desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus* (Carlon e Lippé, 2007), em quatro espécies, pertencentes à família Labridae: *Scarus trispinosus*, *Halichoeres brasiliensis*, *Sparisoma frondosum* e *Sparisoma axillare*, e verificar sua aplicabilidade em estudos ecológicos para as espécies brasileiras em questão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de coleta e procedimentos laboratoriais

As amostras de tecido proveniente da nadadeira anal das quatro espécies da família Labridae - *Scarus trispinosus*, *Halichoeres brasiliensis*, *Sparisoma frondosum* e *Sparisoma axillare* – foram obtidas através de desembarques pesqueiros dos municípios de Porto Seguro e Coroa Vermelha, Bahia, entre os anos de 2015 e 2016. As amostras foram mantidas em álcool PA até sua extração. Foram utilizadas amostras de dez indivíduos de *S. trispinosus*, *H. brasiliensis* e *S. frondosum* e cinco indivíduos de *S. axillare*. A extração do DNA foi realizada seguindo os passos descritos pelo protocolo de extração do kit DNeasy (Qiagen). A integridade do DNA extraído foi checada em gel

de agarose 1%, posteriormente quantificado utilizando o Nanodrop (Thermo Scientific/Nanodrop, Wilmington, DE), e as amostras diluídas a uma concentração de 30 ng/μl de DNA.

Os 17 locos utilizados foram sintetizados para a espécie *Scarus rubroviolaceus* (Carlson e Lippé, 2007; Tabela 1) e testados quanto sua amplificação cruzada em *Scarus trispinosus*, primariamente, e nas demais espécies brasileiras amostradas devido a sua proximidade filogenética e a ausência de outros marcadores microssatélites publicados na literatura ou na plataforma GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

O protocolo de reação PCR foi realizado com base em um volume de reação de 11 μL contendo: 1 μL (30 ng) de DNA, 1X de tampão KCl, 2.0 mM de MgCl₂, 0.08 mM de cada dNTP, 0.18 mM de cada primer, 0.5 U de Taq DNA Polimerase e H₂O ultrapura. A reação de PCR seguiu o protocolo touchdown 60-48 que consistiu das seguintes fases: desnaturação, anelamento e extensão das moléculas de DNA com temperatura inicial de 94°C por 5', seguido por 10 ciclos de 94°C por 30", 60°C por 1' e 72°C por 1:30", seguido por 30 ciclos de 94°C por 30", 48°C por 1', 72°C por 1:30" e uma extensão final de 72°C por 30' (Gramacho et al., 2007). Os produtos de PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red TM/Uniscience e visualizado sob luz ultravioleta no fotodocumentador L-Pix EX/Loccus Biotecnologia.

A fim de genotipar alguns exemplares, foram selecionados aleatoriamente quatro indivíduos de cada uma das espécies estudadas. Em função de possuímos apenas quatro amostras de *S. axillare* que amplificaram, estabeleceu-se esse número como padrão para as demais espécies trabalhadas. Devido a que o foco da dissertação tenha sido sobre a espécie *S. trispinosus*, foram aproveitados somente os 5 locos microssatélites (Sru-C127, Sru-D5, Sru-A7, Sru-A8, Sru-A9; descritos por Carlson e Lippé, 2007) que já haviam sido selecionados e marcados anteriormente com fluorescência (6FAM, NED ou VIC) para esta espécie e utilizados nas demais espécies de Labridae. Os produtos de PCR das reações duplex e triplex foram diluídos a 1:30 com água ultrapura. Posteriormente, 1 μl dessa mistura foi pipetado e transferido para outra placa onde foi adicionado 9μl da solução Liz-HiDi (0,2μl de Liz500 + 8,8μl de HiDi). O produto das amplificações foi analisado em polímero desnaturante de alta resolução em capilar de analisador automático de DNA ABI 3500® Genetic Analyzer/Applied Biosystems. A genotipagem foi realizada usando o programa GeneMarker (Softgenetics, State College, PA,USA).

2.2 Análises estatísticas

O número total de alelos (A), a heterozigidade observada (H_O) e esperada (H_E) para cada loco e espécie e a frequência alélica foram obtidos com Genetix (Belkhir et al., 1996,2004). Riqueza alélica (R_s) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram calculados através de 10.000 permutações aleatórias usando Fstat v 2.9.3. (Goudet, 2002) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984). Para checagem de alelos nulos, foi utilizado o Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

3. RESULTADOS

Dos 17 locos testados, observou-se amplificação bem-sucedida de cinco locos (29,4%) para *Scarus trispinosus*, 9 locos (52,9%) para *Halichoeres brasiliensis*, 13 locos para *Sparisoma frondosum* (76,4%), e 11 locos (64,7%) para *Sparisoma axillare* (Tabela 1).

Tabela 1. Amplificação de 17 microssatélites testados em 4 espécies da família Labridae. 1 = amplificou e 0 = não amplificou. Em negrito os locos que amplificaram para todas as espécies testadas.

ID	Locos	Motif	<i>Scarus trispinosus</i>	<i>Halichoeres brasiliensis</i>	<i>Sparisoma frondosum</i>	<i>Sparisoma axillare</i>	Média /loco
L1	Sru-B118	(AGGG)7	0	0	1	0	0.25
L2	Sru-C121	(TCCA)9	0	0	1	1	0.5
L3	Sru-C127	(TCCA)10	1	0	1	0	0.5
L4	Sru-C11	(AGGG)7	0	1	1	0	0.5
L5	Sru-C110	(TCCA)10	0	1	1	1	0.75
L6	Sru-D4	(GATG)8	0	1	0	1	0.5
L7	Sru-D5	(GATG)8	1	1	0	1	0.75
L8	Sru-D110	(TATC)19	0	1	0	0	0.25
L9	Sru-A7	(TG)25	1	1	1	1	1
L10	Sru-A8	(CTTT)10	1	1	1	1	1
L11	Sru-A9	(GATG)7	1	1	1	1	1
L12	Sru-B12	(TCCA)7	0	0	0	1	0.25
L13	Sru-B115	(TATC)17	0	0	1	0	0.25
L14	Sru-C4	(TATC)11	0	0	1	1	0.5
L15	Sru-C105	(AGGG)7	0	0	1	1	0.5
L16	Sru-D103	(TCCA)9	0	0	1	1	0.5
L17	Sru-D104	(TCCA)10	0	1	1	0	0.5

O número de alelos por loco variou de 1 a 4, sendo os locos A9 e D5 os que mais contribuíram para a diversidade gênica total ($H_{nb}=0.563$). Com exceção de *S. frondosum* ($H_E = 0,629$ e $H_O = 0,437$), a heterozigidade média observada e esperada

variou pouco entre as espécies, apresentando em média $H_o = 0,5185$, $H_e = 0,6172$ (Tabela 2).

A maior e a menor riqueza alélica foram registradas em *S. axillare* e *S. trispinosus* respectivamente, já *H. brasiliensis* foi a espécie com a maior H_o enquanto *S. frondosum* apresentou o menor valor de heterozigosidade (Tabela 2). Dos locos quantificados geneticamente, os denominados A8, A9 e D5 foram monomórficos para *S. trispinosus*, enquanto C127 o foi para *H. brasiliensis* e *S. frondosum* (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas sumárias dos 5 locos microssatélites para as 4 espécies da família Labridae. Foi utilizado N = 4 indivíduos para todas as espécies testadas. (A = número de alelos, Rs = riqueza alélica, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada, Fis = coeficiente de endogamia de um indivíduo em relação a subpopulação)

	Sru-A8	Sru-A7	Sru-C127	Sru-A9	Sru-D5	Todos locos
<i>S. trispinosus</i>						
A	1	3	4	1	1	2
Rs	1,000	1,464	1,750	1,000	1,000	1,2428
H_o	0,0000	0,5000	0,5000	0,0000	0,0000	0,5
H_e	0,0000	0,4643	0,7500	0,0000	0,0000	0,6071
Fis	NA	0	0,368	NA	NA	0,200
<i>H. brasiliensis</i>						
A	3	2	1	3	3	2,4
Rs	1,600	1,533	1,000	1,714	1,607	1,4908
H_o	0,6667	0,6667	0,0000	0,0000	0,2500	0,5278
H_e	0,6000	0,5333	0,0000	0,7143	0,6071	0,6136
Fis	-0,143	0	NA	1,000	0,625	0,387
<i>S. frondosum</i>						
A	3	2	1	2	4	2,4
Rs	1,733	1,533	1,000	1,500	1,750	1,5032
H_o	0,3333	0,6667	0,0000	0,5000	0,2500	0,4375
H_e	0,7333	0,5333	0,0000	0,5000	0,7500	0,6291
Fis	0,600	0	NA	0,000	0,700	0,344
<i>S. axillare</i>						
A	2	2	2	3	3	2,4
Rs	2,000	1,429	1,333	1,714	1,679	1,631
H_o	1,0000	0,0000	0,3333	0,0000	0,2500	0,5277
H_e	1,0000	0,4286	0,3333	0,7143	0,6786	0,6309
Fis	NA	1,000	0,000	1,000	0,667	0,759

Os locos com maiores números de alelos para *S. trispinosus* foi o Sru-C127 (4 alelos), para *H. brasiliensis*, os locos Sru-A8, Sru-A9 e Sru-D5 apresentaram 3 alelos, para o *S. frondosum* o loco Sru-D5 foi o mais informativo com 4 alelos e por fim para *S. axillare*, os locos Sru-A9 e Sru-D5, ambos apresentaram o máximo de 3 alelos.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a taxa de amplificação cruzada de marcadores desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus* em 4 espécies da família Labridae, sendo 2 do gênero *Sparisoma* e uma espécie dos gêneros *Scarus* e *Halichoeres*. As taxas de êxito variaram entre 30% (*S. trispinosus*) e 76% (*S. frondosum*), similares as taxas de sucesso encontradas para outras espécies de peixes marinhos. Por exemplo, para *Centropyge bispinosae* e 8 demais espécies a taxa de transferabilidade variou entre 60 e 93% (Grulois, et al., 2015), enquanto que para *Epinephelus striatus* e espécies congêneres o sucesso variou entre 33 e 60% (Bernard et al., 2012) e, em um estudo com duas espécies do gênero *Amphiprion* se observou uma variação de 34 e 74% (Zhang et al., 2016).

No entanto, quando se avalia a porcentagem de sucesso com relação a afinidade taxonômica dos grupos testados, os resultados encontrados discordam com os dados da literatura. O êxito da amplificação cruzada dos microssatélites confeccionados para a espécie *S. rubroviolaceus* foi menor entre as espécies do mesmo gênero (*S. rubroviolaceus* - *S. trispinosus*) em comparação as demais espécies (*S. rubroviolaceus* – *H. brasiliensis*, *S. frondosum* e *S. axillare*). Estudos demonstram que a amplificação cruzada de marcadores microssatélites declina à medida que a distância genética entre os táxons aumenta. Portanto, as relações filogenéticas entre a espécie focal e as espécies teste são de extrema importância para o sucesso da transferência dos marcadores (Primer; Merila, 2002).

Em uma revisão, Barbará et al. (2007) revelou que em estudos com espécies de peixes do mesmo gênero, esta transferabilidade pode chegar à cerca de 70%, diminuindo para 60% entre gêneros dentro de uma mesma família e para 20% entre famílias dentro de uma mesma ordem. Contrário ao esperado, este fato sugere uma maior proximidade filogenética de *S. rubroviolaceus* com as espécies da mesma família, porém de gêneros distintos - *Sparisoma* e *Halichoeres*, e maior distância da espécie congênera testada, o *S. trispinosus*.

O número de alelos por loco encontrado em todas as espécies variou pouco, mantendo uma média de aproximadamente 2,3 alelos/loco. Esse resultado provavelmente está limitado pelo baixo número de amostras utilizadas (4 indivíduos). Adicionalmente foi encontrada homologia de três marcadores para as quatro espécies, podendo ser então utilizados como ferramenta genética de comparação entre as espécies

estudadas. A partir desses resultados, foi possível confirmar que existe um grande potencial de uso dos marcadores desenvolvidos para *S. rubroviolaceus* para espécies relacionadas, principalmente as do gênero *Sparisoma* e *Halichoeres*. Tais marcadores podem ser utilizados, por exemplo, para identificação de espécies, particularmente durante as fases iniciais de vida dessas espécies, onde a morfologia e a coloração típica dos adultos são ausentes, assim como para estudos ecológicos, visto que muitas destas espécies se encontram ameaçadas de extinção. Contudo, novos marcadores moleculares específicos devem ser desenvolvidos para *S. trispinosus*, para permitir um melhor entendimento sobre aspectos populacionais e sua relação de parentesco com as demais espécies da família.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arigoni S., Largiadèr C. R., 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci from the ocellated wrasse *Symphodus ocellatus* (Perciformes: Labridae) and their applicability to related taxa, *Molecular Ecology*. 9, 2166-2169.

Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, C., 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*. 16, 3759–3767.

Bartley, D.M.; Pullin, R.S.V. Aquatic genetic resources policy. In: Pullin, R.S.V.; Bartley, D.M.; Kooiman, J. (eds.). *Towards Policies for Conservation and Sustainable Use of Aquatic Resources*. ICLARM Conf. Proc. 59, Manila, Philippines, 1999, 1-16 p.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996 e 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bellwood, D. R., 1994. A phylogenetic study of the parrotfishes family Scaridae (Pisces: Labroidei), with a revision of genera. *Records of Australian Museum*. (20).

Bellwood, D. R., Wainwright, P. C., 2001. Locomotion in labrid fishes: Implications for habitat use and cross-shelf biogeography on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*. 20(2), 139-150.

Bernard, A. M., Feldheim, K. A., Richards, V. P., Nemeth, R. S., Shivji, M. S., 2012. Development and characterization of fifteen novel microsatellite loci for the Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) and their utility for cross-amplification on a suite of closely related species. *Conservation Genetics Resources*. 4 (4), 983–986.

Caixeta, E. T.; Oliveira, A. C. B.; Brito, G. G.; Sakiyama, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; Caixeta, E. T. (ed). *Marcadores moleculares*. Viçosa, MG, 2006. 9-77pp.

Carlson, D. B. e Lippé, C., 2007. Isolation and characterization of 17 new microsatellite markers for the ember parrotfish *Scarus rubroviolaceus*, and cross-amplification in four other parrotfish species. *Molecular Ecology Notes*. 7, 613–616.

Cockerham, C. C.; Weir, B. S., 1984. Co-variances of relatives stemming from a population undergoing mixed, self and random mating. *Biometrics*. 40, 157-164.

Fernández J.I., Álvarez-Torres P., Arregún-Sánchez F. López-Lemus L.G., Ponce G., Díazde- León A., Arcos-Huitrón E., Monte-Luna P., 2011. Coastal fisheries of Mexico. In: Slas S., Chuenpagdee R., Charles A., Seijo J.C. (eds). *Coastal fisheries of Latin America and the Caribbean*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 231 - 284.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, 1998. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20).

Francini-Filho, R.B., Moura, R.L., 2008. Dynamics of fish assemblages on coral reefs subjected to different management regimes in the Abrolhos Bank, eastern Brazil. *Aquatic Conservation and Marine and Freshwater Ecosystem*. 18, 1166-1179.

Gramacho, K. P., Risterucci, A. M., Lanaud, C., Lima, L. S., Lopes, U. V., 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis perniciosus*. *Molecular Ecology Notes*, Oxford. 7:1, 153-155.

Grulois, D., Planes, S., Fauvelot, C., 2015. Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in two-spined angelfish *Centropyge bispinosa* (family

Pomacanthidae) with cross-amplification success in four *Centropyge* congeners. *Conservation Genet Resource*. 7, 291–293.

Goudet, J., 2002. Fstat Version 2.9.3.2. A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat>.

Guillemaud, T., Almada, F., Santos, R. S., Cancela, M. L., 2000. Interspecific utility of microsatellites in fish: a case study of (CT)_n and (GT)_n markers in the *Shanny* *Lipophrys pholis* (Pisces: Blenniidae) and their use in other Blennioidei. *Marine Biotechnology*. 2:248–253

Holmen, J., Vollestad, L. A., Jakobsen, K. S., Primmer, C. R., 2005. Cross-species amplification of zebrafish and central stoneroller microsatellite loci in six other cyprinids. *Journal of Fish Biology*. 66, 851–859.

Martínez-Cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J.J., O'Brien, S., Jand Johnson, W. E., 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes*. 2, 323-326.

Moore, S. S, Sargeant, L.L., King, T.J., Mattick, J.S., Georges, M., Hetzel, D.J., 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 10, 654 - 660.

Pauly D.V., Christensen S., Dalsgaard J., Froese R., Torres Junior F., 1998. Fishing down marine food webs. *Science*. 279, 860 - 863.

Primmer, C. R., Moller, A.P., Ellegren, H., 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*. 5, 365-378.

Primmer, C., Merilä, J., 2002. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics*. 3(4), 445-449.

Ryman, N.; Utter, F. *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle: Univ. Washington Press, 1987

Streelman JT, Alfaro M, Westneat MW, Bellwood DR, Karl SA. 2002. Evolutionary history of the parrotfishes: biogeography, ecomorphology, and comparative diversity. *Evolution* 56: 961–971.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P.F., 2004. MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 535-538.

Westneat MW, Alfaro ME. 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the reef fish family Labridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 370–390.

Zhang, Q., Allen Jr, S.K., Reece K.S., 2005. Genetic variation in wild and hatchery stocks of Suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers. *Marine Biotechnology*. 7, 588, 599.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM UMA ESPÉCIE ENDÊMICA AMEAÇADA DA COSTA BRASILEIRA, *SCARUS TRISPINOSUS* (VALENCIENNES, 1840)

RESUMO

O budião azul, *Scarus trispinosus*, é o maior peixe herbívoro que habita os recifes brasileiros, e possui alto valor econômico na sua região de ocorrência. Recentemente o declínio populacional o levou a ser incluído na lista vermelha de espécies ameaçadas como em perigo devido à sobre-exploração de suas populações. Para o manejo dos estoques pesqueiros é essencial compreender como as escalas de conectividade populacionais atuam na distribuição e na manutenção de populações marinhas, sendo as ferramentas moleculares ideais para seu estudo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a existência de unidades populacionais ao longo de um trecho de costa de aproximadamente 2000 km. Foram testados 17 primers sintetizados para a espécie *Scarus rubroviolaceus* e sua transferabilidade para a espécie endêmica congênera *S. trispinosus* onde obteve-se com sucesso 5 locos. A heterozigiosidade média observada e a riqueza alélica foram maiores nas localidades de Corumbau e Caravelas, indicando um reduto de diversidade genética na região do Banco dos Abrolhos, Bahia. Pernambuco foi a localidade com menor número de alelos, e juntamente com Porto Seguro, apresentaram o menor nível de heterozigiosidade. Tais resultados podem indicar um efeito deletério da pesca, diminuindo assim a diversidade genética das populações. Não houve diferença genética significativa entre as localidades amostradas ($F_{ST} = 0.0084$, $p > 0,05$), evidenciando a presença de uma única população genética. Os resultados indicam que medidas de proteção como as áreas marinhas protegidas são eficazes na conservação da diversidade genética. A ausência de unidades genéticas distintas ocorre provavelmente devido a um alto fluxo gênico atribuído ao estágio larval ainda desconhecido e a dinâmica das correntes oceânicas que agem homogeneizando os indivíduos. Tal resposta pode ser aplicada diretamente no manejo desta espécie visando suprir áreas adjacentes intensamente pescadas com novos indivíduos através de estratégias de repovoamento. No entanto, é importante que marcadores moleculares específicos sejam desenvolvidos para a elaboração de mais estudos para a conservação desta espécie ameaçada.

Palavras chaves: Marcadores moleculares, conectividade, SSR, Genética de populações, Budião azul

GENETIC DIVERSITY AND GENE FLOW IN A THREATENED ENDEMIC SPECIES OF THE BRAZILIAN COAST, *SCARUS TRISPINOSUS* (VALENCIENNES, 1840)

ABSTRACT

The greenback parrotfish, *Scarus trispinosus*, is the largest herbivorous fish inhabiting Brazilian reefs, and has high economic value in its region of occurrence. Recently the population decline has led him to be included in the red list of threatened species as endangered due to the overexploitation of their populations. For the management of fish stocks, it is essential to understand how the scales of population connectivity work in the distribution and maintenance of marine populations, and the molecular tools are ideal for this kind of study. The aim of this work was to evaluate the existence of genetic unities along a coast stretch of approximately 2000 km. A total of 17 primers synthesized for *Scarus rubroviolaceus* and their transferability to the endemic Brazilian species *S. trispinosus* were tested, in which 5 transferable loci were used. The observed average heterozygosity and allelic richness were higher in the localities of Corumbau and Caravelas, indicating a enrichment of genetic diversity in the region of the Abrolhos Bank, Bahia. Pernambuco was the locality with the lowest number of alleles, and together with Porto Seguro, they presented the lowest level of heterozygosity. These results may be consequence of a deleterious effect of fishing thus reducing the genetic diversity of the population. These findings indicate that protection measures such as marine protected areas may be very effective in conserving genetic diversity. The absence of distinct genetic units is probably due to a high gene flow attributed to the still unknown larval stage and the dynamics of the oceanic currents that act to homogenize the individuals. This response can be directly applied in the management of this species aiming at supplying adjacent areas intensely fished with new individuals through replenishment strategies. It is important to emphasize that new and specific molecular markers need to be developed in order to allow further studies aiming the conservation of this endangered species.

Keywords: Molecular markers, connectivity, SSR, Population genetics, Greenback parrotfish

1. INTRODUÇÃO

Um dos processos mais interessantes que ocorrem dentro do grupo dos peixes é a forma como independente do modo de vida que apresentem (pelágicos ou sedentários), estas espécies demonstram grande capacidade de se dispersarem no ambiente marinho (Sale, 1980; Bernardi, 2011). Essa fase de dispersão pelágica é essencial para o povoamento de novos habitats e para a conservação das populações, uma vez que garante o aumento da conectividade genética entre estes indivíduos (Leis e McCormick, 2002). Assim, estudos de fluxo gênico e variabilidade genética constituem uma ferramenta útil para pesquisas relacionadas a conectividade entre populações, proporcionando importantes informações sobre a história de vida e as pressões de seleção que moldaram a variação genética, bem como os processos mutacionais que geram variabilidade dentro das populações (Conrad e Hurles, 2007).

As correntes oceânicas e a dinâmica de ventos costeiros desempenham um papel fundamental para o fluxo de genes em ambientes marinhos (Cowen et al., 2006, 2007), onde agem facilitando a dispersão das larvas e homogeneizando a maioria das populações marinhas, podendo apresentar assim taxas relativamente baixas de estrutura nestas populações de peixes (Hauser e Carvalho, 2008). Uma compreensão detalhada de todos estes processos é crucial para o desenvolvimento de estratégias de conservação, em especial para espécies de peixes sobreploadas e/ou ameaçadas de extinção, em que as pressões de captura e a destruição de habitats essenciais a fases específicas do ciclo de vida podem levar ao isolamento genético dessas populações (Craig, 2011).

Os processos de conectividade são altamente variáveis a múltiplas escalas espaciais e somente com o auxílio de ferramentas alternativas é possível compreender seus padrões de variação. Dentre estas ferramentas encontram-se os marcadores moleculares nucleares, como os microssatélites. Estes marcadores vêm sendo amplamente utilizados em estudos de dinâmica populacional devido a sua codominância e neutralidade a seleção, que somada a sua hipervariabilidade e fácil replicação, os tornam ideais para o mapeamento genômico, assim como estudos de genética populacional (variabilidade alélica, conectividade, testes de parentesco etc.; Dayanandan et al., 1998; Saenz-Agudelo et al., 2009).

Uma maneira de aumentar a utilidade dos microssatélites, uma vez isolados e sequenciados em uma espécie, é transferir estes marcadores para espécies relacionadas, o que tem sido feito em numerosas publicações de espécies de peixes (Primmer et al.,

1996). Em quase todos os estudos envolvendo a amplificação cruzada entre espécies, alguns iniciadores concebidos para uma espécie podem ser utilizados para amplificar locos ortólogos em espécies relacionadas (Moore et al., 1991, Primmer et al., 1996, Martinez Cruz et al., 2002).

Tais ferramentas são especialmente úteis no estudo de espécies que se encontram em algum nível de ameaça, devido a três principais características: o fato de que os indivíduos não necessitam ser sacrificados para a retirada de material genético; por possuírem um grande poder de resolução espacial, tanto em larga como em pequena escala, e também pelo aumento da relação custo-benefício com o desenvolvimento de tecnologias mais baratas e de alto rendimento. Sendo assim, a combinação de técnicas moleculares com amostragens biológicas fornecem uma potente ferramenta para o entendimento de processos a múltiplas escalas como são os processos de dispersão e conectividade de populações marinhas (Freeland, 2005; Selkoe et al., 2008).

Nesse contexto, os peixes conhecidos popularmente como budiões ou peixes-papagaio (Labridae: Scarinae) representam o grupo dominante dentre os herbívoros recifais (junto com a família Acanthuridae), sendo membros de grande importância ecológica das comunidades em vários recifes tropicais (Ogden e Buckman 1973; Lewis e Wainwright, 1985; Choat et al., 2002; Hoey e Bellwood, 2008), além disso, devido a sua forma de forrageio, são responsáveis por moldar estruturalmente os recifes (Frydl e Stearn, 1978). Estudos de genética populacional ainda são escassos para as espécies endêmicas de peixes papagaios no Brasil apesar da crescente exploração comercial sobre a sub-família Scarinae.

O budião azul, *Scarus trispinosus*, é uma espécie herbívora vágil de alto valor econômico na sua região de ocorrência (Francini-Filho e Moura, 2008) que ocorre na costa brasileira desde o Rio Grande do Norte até a costa de Santa Catarina (Floeter et al., 2005), alcançando até 30 m de profundidade (Moura et al., 2001). São hermafroditas protogínicos, ou seja, nascem fêmeas e posteriormente tornam-se machos (Sadovy, 2001), sendo que a retirada dos indivíduos maiores (selecionados através da pesca), leva rapidamente a uma desestruturação populacional (Coleman et al., 2000; Sadovy, 2001). São espécies que forrageiam de dia e a noite se recolhem em tocas, onde são facilmente observados em mergulhos noturnos, tornando-os susceptíveis a caça (com. pess. Félix-Hackradt, 2017). Estas características biológicas e ecológicas da espécie, combinadas com a sobrepesca resultaram na sua inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção da IUCN como em perigo e, em 2014, foi promulgada legislação específica (Portaria nº

445/14) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) que proíbe a captura, pesca ou venda de budião azul em qualquer ponto do litoral brasileiro. Adicionalmente, *S. trispinosus* foi considerada a espécie de budião mais ameaçada do mundo (Comeros-Raynal et al., 2012).

Contudo, pouco se sabe ainda sobre variados aspectos biológicos e ecológicos desta espécie, e somente através do trabalho de Moura e colaboradores (2001) que sua presença como espécie endêmica do Atlântico Sudoeste foi confirmada. De acordo com Francini-Filho e Moura (2008) a espécie *Scarus trispinosus* compõe grande parte da biomassa de peixes existente em uma das áreas mais importantes do Atlântico Sul, o banco dos Abrolhos. Esta área contempla a mais extensa formação recifal do Atlântico Sul albergando inúmeras espécies de corais endêmicos (Francini-Filho e Moura, 2008).

Nos últimos 15 anos *S. trispinosus* se tornou um dos recursos pesqueiros mais importantes da sua região de ocorrência devido a introdução da caça submarina (Francini-Filho e Moura 2008). Contudo, devido ao seu papel como mantedor da saúde dos recifes coralíneos, através do controle da cobertura algal permitindo assim o crescimento dos corais, seu desaparecimento através da sobrepesca pode trazer consequências irreversíveis para o ecossistema coralíneo, ressaltando a necessidade do manejo de suas populações.

Muitas das reservas marinhas implementadas até os dias atuais no Brasil e no mundo foram construídas através de medidas políticas que muitas vezes não apresentaram qualquer suporte científico para a sua instalação, principalmente no que diz respeito a localização e o desenho adotado. O entendimento dos processos de conectividade populacional e suas escalas espaciais são fundamentais para a correta instalação de reservas marinhas que pretendem garantir a conservação da biodiversidade. Nesse sentido o presente trabalho objetivou determinar a existência de estoques populacionais de *Scarus trispinosus* ao longo da costa brasileira, sua diversidade genética e conectividade entre os diversos grupos de indivíduos amostrados ao longo da costa. Adicionalmente, avaliou-se o nível de estrutura genética e os possíveis efeitos da pesca sobre a diversidade genética populacional, com o intuito de subsidiar a criação de redes de reservas marinhas para este fim, garantindo o fluxo de indivíduos e conseqüentemente repovoamento das áreas adjacentes pressionadas pela pesca.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

A área avaliada neste estudo contemplou um trecho de costa de aproximadamente 2000 km, que se estende desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Norte (Figura 1).

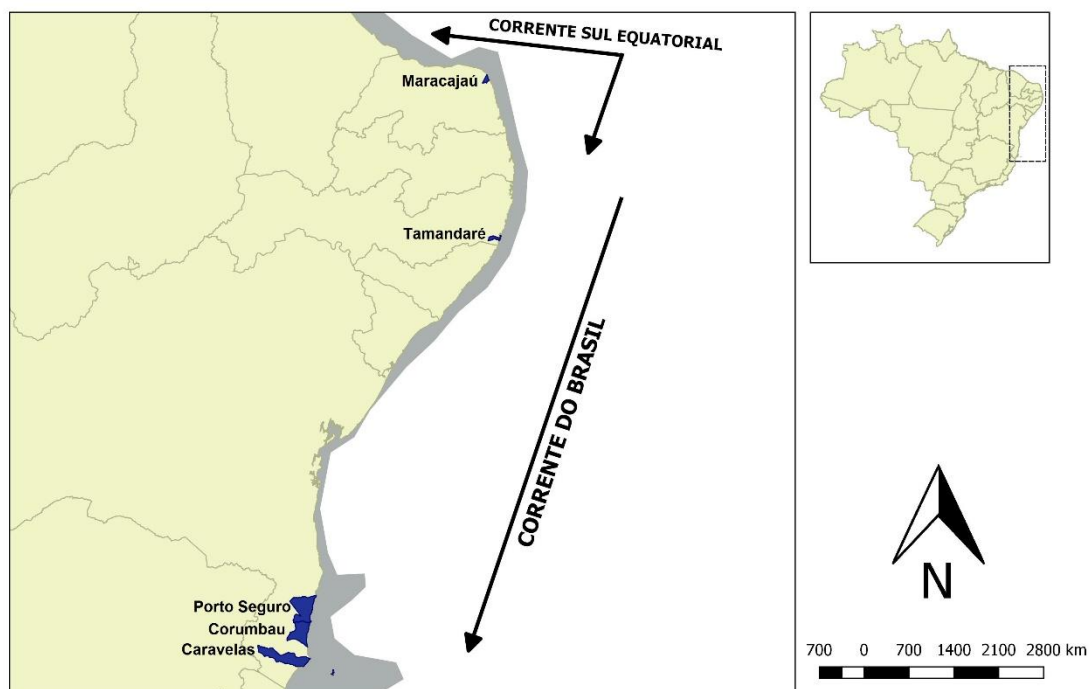


Figura 1. Mapa mostrando os municípios onde foram realizadas coletas de *S. trispinosus*, largura da plataforma continental e direções das correntes oceânicas que influenciam na dinâmica do litoral brasileiro.

Tais localidades estão inseridas na chamada costa tropical brasileira, contemplando desde o litoral maranhense até a costa do Rio de Janeiro, onde se concentram as principais formações recifais coralíneas (Leão e Dominguez 2000). Estas são especialmente únicas, distinguindo-se dos demais sistemas recifais encontrados no mundo devido (i) a estrutura de crescimento na forma de chapeirões, ocorrentes em Abrolhos, (ii) a baixa diversidade de espécies construtoras compostas de espécies antigas, porém com alto grau de endemismo (das 23 espécies de corais na costa brasileira, 25% são endêmicas), (iii) e alta influência de sedimentos siliclásticos provenientes da vazão de rios (Leão e Dominguez 2000).

Embora existam diferentes tipos de formação recifal, nas áreas deste estudo predominam os bancos recifais costeiros de ambientes rasos, que durante a maré baixa podem formar piscinas que se conectam entre si através de canais meândricos que percorrem a densa estrutura recifal (Leão et al., 2010). É nesse ambiente que é encontrada a espécie desse estudo.

2.2 Amostragem e extração de DNA

Um número total de 176 amostras de *S. trispinosus* foi coletado entre 2015 e 2016. A amostragem foi realizada em 5 localidades brasileiras: Maracajaú/ RN (N = 44), Tamandaré/PE (N = 14), Porto Seguro/BA (N = 49), Corumbau/BA (N = 17) e Caravelas/BA (N = 52). As amostras representaram um pedaço de tecido de aproximadamente de 2x2 cm retirados da nadadeira anal e foram obtidas junto aos pescadores das regiões. Os tecidos amostrados ficaram armazenados em álcool PA até o momento da extração.

As extrações foram realizadas seguindo o protocolo do Kit de extração DNeasy da Qiagen®. Para conferir a integridade do DNA nas extrações que foram realizadas, foi feita a checagem através da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2) e quantificação através do Picodrop®.

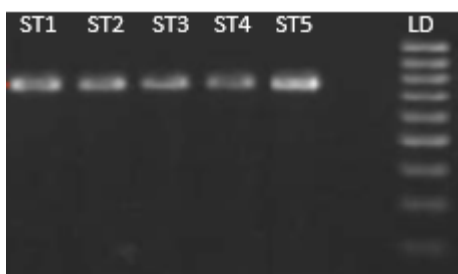


Figura 2. Exemplo da extração através da eletroforese em gel de agarose 1%. As canaletas de 1 a 5 são amostras de DNA de *Scarus trispinosus*. Não há conteúdo na canaleta 6. A última coluna (7), representa o 100 bp DNA Ladder, Invitrogen by Life Technologies.

2.3 Amplificação e Genotipagem

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fitopatologia Molecular (FITOMOL) no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). Cinco locos de marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos para *Scarus rubroviolaceus* (Carlson e Lippé, 2007) foram utilizados para a espécie de estudo através da amplificação cruzada (*cross-amplification*, conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho). Os iniciadores *forward*

de cada par de primer foram marcados com fluorocromos de cores 6FAM (azul), NED (amarelo) ou VIC (verde) (Tabela 1; ver capítulo 1 para maiores detalhes).

A amplificação foi realizada com base em um volume de reação de 11 μ L contendo: 1 μ L (25–50 ng) de DNA, 1X de tampão KCl, 2.0 mM de MgCl₂, 0.08 mM de cada dNTP, 0.18 mM de cada primer, 0.5 U de Taq DNA Polimerase e H₂O ultrapura. As reações foram realizadas nas condições: 94°C por 5', 10 ciclos de 94°C por 30", 60°C por 1' e 72°C por 1:30", seguido por 30 ciclos de 94°C por 30", 48°C por 1', 72°C por 1:30" e uma extensão final de 72°C por 30' (Gramacho et al., 2007). A qualidade do produto da PCR foi verificada por meio de gel de agarose 2% corado com Gel Red™/Uniscience e visualizado sob luz azul no fotodocumentador L-Pix EX/Loccus Biotecnologia. Os produtos de PCR das reações duplex e triplex foram diluídos a 1:30 com água ultrapura. Posteriormente, 1 μ l dessa mistura foi diluída adicionando 9 μ l de solução Liz-HiDi (0,2 μ l de Liz500 + 8,8 μ l de HiDi). O produto das amplificações foi analisado em polímero desnaturante de alta resolução em capilar de analisador automático de DNA ABI 3500® Genetic Analyzer/Applied Biosystems. A genotipagem foi realizada usando o programa GeneMarker (Softgenetics, State College, PA, USA).

Tabela 1. Sequências dos microssatélites e cores usadas para marcar e a separação em duplex e triplex.

LOCO	TEMPERATURA (°C)	TAMANHO (pb)	COR	MULTIPLEX
L3	TD 60-48	223 - 239	6FAM	TRIPLEX
L7	TD 60-48	279 - 291	NED	TRIPLEX
L11	TD 60-48	233 - 263	VIC	TRIPLEX
L10	TD 60-48	257 - 289	6FAM	DUPLEX
L9	TD 60-48	238 - 256	VIC	DUPLEX

2.4 Análise de dados

Os mapas apresentados foram elaborados utilizando os programas Quantum Gis versão 2.18.2 e Inkscape versão 0.91. Alelos nulos foram confirmados através de novas amplificações e ajustes no protocolo de reação. Os alelos foram dimensionados e marcados com o software GeneMarker (Softgenetics, State College, PA, USA) por comparação com o padrão de tamanho interno genescan-500 LIZ (Applied Biosystems, Inc.).

O número total de alelos (A) e alelos exclusivos (N_a), a heterozigosidade observada (H_O), esperada (H_E) e esperada não enviesada (H_{NB}) para cada loco e a

frequência alélica foram obtidos no programa Genetix (Belkhir et al., 1996, 2004). Os desvios em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e as estimativas de desequilíbrio de ligação por loco e por localidade foram determinados usando a abordagem de randomização que aplica correções de Bonferroni no programa Arlequin (Excoffier et al., 1992, 2005). Para checagem de alelos nulos, foi utilizado o Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

Foram utilizados os estimadores (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) da estrutura genética, derivados dos índices de fixação (F) de Wright, descritos em Weir & Cockerham (1984) devido ao baixo número de indivíduos e de locos marcados, seguindo Gaggiotti e colaboradores (1999). Os índices de fixação (F) e a riqueza alélica (R_s) foram estimados pelo programa F_{STAT} v.2.9.3.2 (Goudet, 2002) usando 10.000 permutações. A diferenciação entre as populações amostradas foi quantificada pelo F_{ST} par-a-par e testado por 10.000 permutações no programa Genetix v.4.1 (Belkhir et al., 1996 e 2004). Em seguida, para visualizar as distâncias genéticas entre os indivíduos de cada localidade, uma matriz de distância genética derivada da estimativa de F_{ST} em pares foi usado para construir uma análise de coordenadas principais (PCoA) das populações, utilizando o programa GenAlex (Peakall e Smouse, 2012). A abordagem bayesiana implementada no programa Structure v.2.3 (Pritchard et al., 2000) foi utilizada para designar perfis genéticos de indivíduos a possíveis populações. O número de interações utilizadas no “burn-in” e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) foram de 100.000 e 50.000, respectivamente, usando o modelo de mistura (admixture) com nenhuma informação local prévia.

O método de Evanno et al. (2005) calcula a taxa de variação média da probabilidade posterior entre 2 grupos diferentes (ΔK) em função de K , e os valores resultantes do modo de distribuição de K é considerado o melhor número de clusters. No entanto, para calcular um valor de ΔK é necessário um mínimo de 2 grupos, e, portanto, uma população homogênea completa nunca é selecionada por este método. Assim, foi estabelecido $K = 7$ (número de localidades amostradas + 2) para que fosse realizado o teste. O valor mais provável de K foi determinado pelo critério ΔK descrito por Evanno et al. (2005) a partir do programa Structure Harvester (Earl e Vonholdt, 2012).

Além disso, o fluxo gênico foi estimado pelo número de migrantes trocados entre pares de populações utilizando N_m , Wright (1949). Finalmente, a variação entre os grupos genéticos descritos pelas análises anteriores (Structure e PCoA) foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) no software Arlequin v.3.5.1.2

(Excoffier, et al., 1992, 2005) e os índices de fixação calculados das frequências genotípicas.

3. RESULTADOS

3.1 Variabilidade Genética

Um total de 21 alelos foram encontrados nos 5 locos testados. Não foram encontrados alelos nulos nas populações. O número de alelos por loco variou de 1 (Sru-A9) a 9 (Sru-C127), sendo o último o que mais contribuiu para a diversidade gênica total ($H_{NB}=0,8320$) (Tabela 2). A heterozigosidade média observada e a riqueza alélica foram mais elevadas em Corumbau e Caravelas. Pernambuco foi a localidade com menor número de alelos, e juntamente com Porto Seguro apresentou o menor nível de heterozigosidade (Tabela 2). Caravelas e Pernambuco também abrigaram os maiores valores de coeficiente de endogamia (0,46 e 0,41, respectivamente), enquanto o menor foi encontrado nos indivíduos do Rio Grande do Norte. Não houve desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni em nenhuma das populações estudadas. Foi encontrado evidência de desequilíbrio de ligação em 2 locos, Sru-A8 e Sru-C127, apenas na população de Corumbau.

Tabela 2. Estatísticas sumárias de 5 locos microssatélites e a média geral entre 5 localidades de amostragem de *Scarus trispinosus* (N = número de amostras, A = número de alelos Ne = número de alelos exclusivos, Rs = riqueza alélica, Ho = observada heterozigosidade, H_E = heterozigosidade esperada, F_{IS} = coeficiente de endogamia)

Localidades	Locos microssatélites					Média dos locos
	Sru-A8	Sru-A7	Sru-C127	Sru-A9	Sru-D5	
<i>Caravelas (CA)</i>						
N	50	52	52	52	48	50,8
A	2	7	9	1	2	4,2
Ne	0	2	1	0	0	0
Rs	1,393	5,041	6,769	1,000	1,993	3,239
Ho	0,000	0,480	0,788	0,000	0,062	0,266
He	0,396	0,517	0,792	0,000	0,294	0,400
Fis	1,000	0,071	0,005	NA	0,789	0,466
<i>Corumbau (CO)</i>						
N	17	17	16	17	16	16,6
A	2	4	8	1	2	3,4
Ne	1	0	0	0	0	0
Rs	1,882	3,283	7,475	1,000	1,976	3,123
Ho	0	0,352	0,937	0	0,187	0,295
He	0,114	0,315	0,858	0	0,175	0,292
Fis	1,000	-0,122	-0,094	NA	-0,071	0,177
<i>Rio Grande do Norte (RN)</i>						
N	41	41	39	36	35	38,4
A	2	5	8	1	2	3,6
Ne	0	0	0	0	0	0
Rs	1,268	3,002	7,074	1,000	1,974	2,863
Ho	0,024	0,219	0,820	0,000	0,142	0,241
He	0,024	0,226	0,838	0,000	0,227	0,263
Fis	0,000	0,032	0,022	NA	0,375	0,107
<i>PortoSeguro (PS)</i>						
N	49	49	47	41	49	47
A	2	4	8	1	2	3,4
Ne	0	0	0	0	0	0
Rs	1,224	3,035	6,946	1,000	1,979	2,836
Ho	0,020	0,285	0,680	0,000	0,081	0,213
He	0,020	0,260	0,836	0,000	0,247	0,272
Fis	0,000	-0,084	0,082	NA	0,697	0,173
<i>Pernambuco (PE)</i>						
N	14	13	12	11	11	12,2
A	1	2	7	1	2	2,6
Ne	0	0	0	0	0	0
Rs	1,000	1,846	6,909	1,000	2,000	2,551
Ho	0,000	0,076	0,916	0,000	0,090	0,216
He	0,000	0,076	0,833	0,000	0,506	0,283
Fis	NA	-0,054	0,290	NA	1,000	0,412

3.2 Estrutura populacional

A comparação par a par das estimativas de estrutura genética (F_{ST}) entre as localidades amostradas demonstraram que Caravelas foi a única localidade que apresentou diferenças significativas em relação as demais localidades, exceto com relação a Corumbau (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas da N_{em} (diagonal acima) e valores F_{ST} de comparação par a par (diagonal abaixo) entre as localidades amostradas para *S. trispinosus*, respectivamente. Em negrito, valores estaticamente significativos de F_{ST} após testes com 10.000 permutações. CA = Caravelas, CO = Corumbau, RN = Rio Grande do Norte, PE = Pernambuco e PS = Porto Seguro.

	CA	CO	RN	PE	PS
CA	-	73,279	20,936	8,615	10,812
CO	0,0034	-	26,566	1250,25	39,933
RN	0,0118	0	-	69,194	71,679
PE	0,0282	0	0,0036	-	69,694
PS	0,0226	0	0	0	-

O número médio de migrantes por geração usando F_{ST} como estimativa do grau de fluxo de genes entre as localidades amostradas, foi maior para Corumbau e Caravelas. Este valor variou de 8,61 a 1250,25 indivíduos entre os grupos de indivíduos de budião azul (Tabela 3).

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi usada para descrever espacialmente as similaridades genéticas entre os indivíduos amostrados nas localidades estudadas. Os dois primeiros eixos corresponderam respectivamente, a 97.14% e 2.86% da variabilidade total das amostras. O eixo 1 descreve um isolamento da localidade de Pernambuco em relação ao grupo formado por Rio Grande do Norte e Porto Seguro, e um segundo grupo formado pelas localidades Corumbau e Caravelas (Figura 3).

A abordagem bayesiana realizada no Structure corrobora com os resultados obtidos usando estatísticas frequencistas e de distância. Tanto a distribuição de ΔK e a média da probabilidade posterior indicaram um número de clusters (K) selecionado igual a 3 (Tabela 4, Figura 4 (Delta K)); contudo os 3 *clusters* genéticos não representam unidades populacionais geograficamente distintas, indicando a existência de uma única população porém com contribuições de 3 *pools* gênicos distintos (Figura 5).

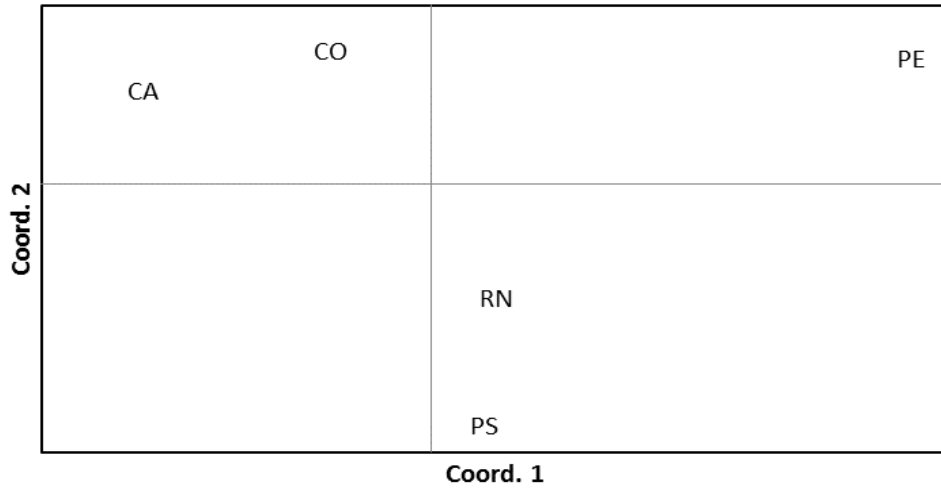


Figura 3. Análise de coordenadas principais para as amostras de *Scarus trispinosus* entre as localidades amostradas: Caravelas (CA), Corumbau (CO), Rio Grande do Norte (RN), Pernambuco (PE) e Porto Seguro (PS).

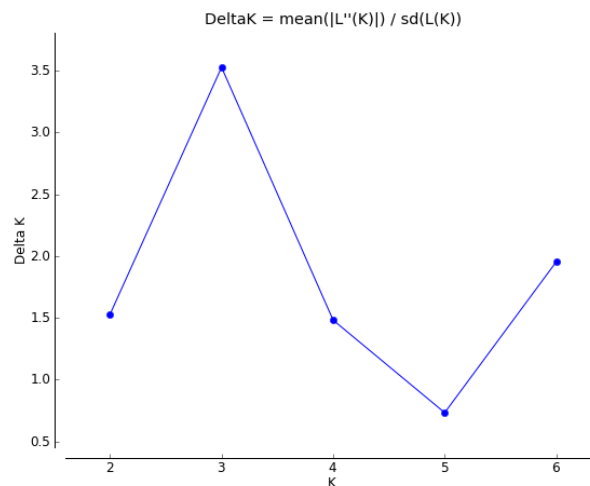


Figura 4: Valores de ΔK para o número de subpopulações (K) com maior probabilidade posterior.

Tabela 4. Número de K, Média do $\text{LnP}(K)$, Desvio Padrão do valor de $\text{LnP}(K)$ e o valor do Delta K. O valor mais alto de K em negrito.

K	MédiaLnP(K)	DesvioP.LnP(K)	Delta K
1	-11,184150	0,2777	
2	-11,860250	571,730	1,528343
3	-11,662550	200,600	3,526420
4	-12,172250	191,660	1,482053
5	-12,397900	315,759	0,73347
6	-12,391950	346,069	1,953659
7	-13,062100	2,954181	

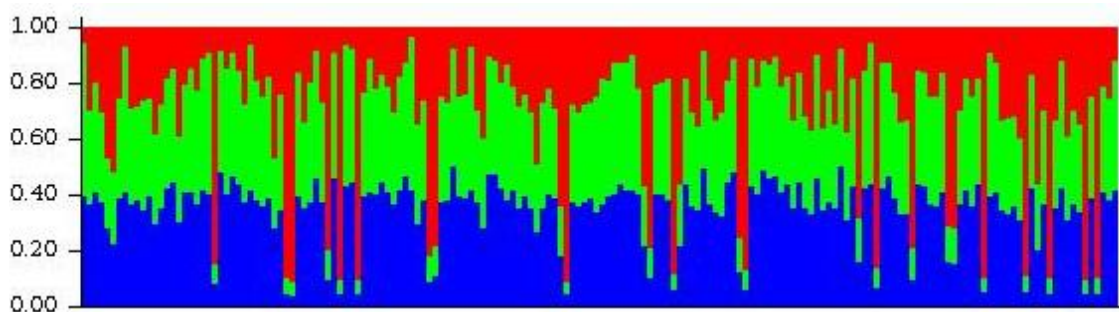


Figura 5. Estrutura genética dos indivíduos de *S. trispinosus* pertencentes a cinco localidades brasileiras, quando avaliadas pelo Programa Structure.

A análise de variância molecular foi realizada seguindo os resultados do Structure e PCoA, respectivamente, utilizando $K=1$ e $K=3$, sendo neste último, o agrupamento 1 composto por Caravelas e Corumbau, o agrupamento 2 por Porto Seguro e Rio Grande do Norte e o agrupamento 3 por Pernambuco. O resultado da análise da variância entre as amostras de *S. trispinosus* considerando $K=1$ e $K=3$, respectivamente, indicou valores médios de F_{ST} baixos, porém significativos, de 0,0075 ($K=3$) e 0,0084 ($K=1$), indicando ausência de estrutura genética populacional, dado que aproximadamente 97% da variância genética total ocorreu entre os indivíduos dentro das localidades amostradas, independente do agrupamento testado ($K = 1$ ou $K = 3$) (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado da AMOVA considerando os agrupamentos genéticos $K=3$ e $K=1$ (em negrito valores de $p < 0.05$). gl = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados

	Fonte da variação	gl	SQ	Componentes da variação	Varição (%)	Índices de fixação
K = 3	Entre populações	2	1,947	0,00420	0,76	
	Dentro das populações	171	96,059	0,01076	1,94	
	Dentro dos indivíduos	174	94,000	0,54023	97,30	$F_{ST} = \mathbf{0,0075}$
	Total	347	192,006	0,55519		
K = 1	Entre populações	4	3,467	0,00467	0,84	
	Dentro das populações	169	94,539	0,00959	1,73	$F_{ST} = \mathbf{0,0084}$
	Dentro dos indivíduos	174	94,000	0,54023	97,43	
	Total	247	192,006	0,55448		

4. DISCUSSÃO

Estes são os primeiros resultados sobre genética populacional de uma espécie endêmica de peixe-papagaio ameaçada de extinção. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, os resultados obtidos mostraram baixa transferabilidade dos marcadores microsatélites originalmente desenvolvidos para a espécie *S. rubroviolaceus* em sua congênere *S. trispinosus* (29,41%), resultando em 5 locos. Embora a abrangência das nossas observações fique limitada devido ao número de marcadores obtidos, importantes observações podem ser feitas.

As amostras obtidas nas localidades de Corumbau e Caravelas, onde situam-se duas importantes unidades de conservação marinhas (RESEX Corumbau e o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos), apresentaram os maiores valores de heterozigosidade média observada e riqueza alélica. Trabalhos recentes corroboram nossos resultados, onde também foi encontrada maior diversidade genética em regiões próximas a áreas protegidas em comparação com áreas abertas a pesca (ver Pérez-Ruzafa et al., 2006, Félix-Hackradt et al., 2013), indicando que as reservas marinhas podem atuar como reservatórios genéticos, contribuindo para o aumento da diversidade genética no seu entorno.

Adicionalmente, o alargamento da plataforma continental na região do Banco dos Abrolhos, que na latitude da cidade de Caravelas-BA apresenta uma largura excepcional de cerca de 200 km (Marchioro et al., 2005), contrastando com a média do Nordeste que é de aproximadamente 63 km (Vital et al., 2005), pode ter contribuído para o resultado encontrado. A maior extensão da plataforma pode influenciar diretamente na disponibilidade de micro-habitats, refúgios, tocas, alimento (Ferreira et al., 2001) o que poderia justificar uma maior abundância da espécie (Hackradt et al., 2017, dados não publicados) e conseqüentemente, maior diversidade genética nessa região.

Por outro lado, o menor número de alelos e a menor heterozigosidade observada foram encontrados em Pernambuco e Porto Seguro, respectivamente. Tais resultados podem ser derivados de um processo contínuo de retirada de indivíduos e conseqüente depauperação genética das populações, facilitado pela proximidade dos recifes a costa e pela técnica empregada pelo pescador, o arpão. Um estudo realizado pelo grupo de pesquisa em Ecologia e Ecossistemas Marinhos e Costeiros que avaliou a ocorrência e abundância de *S. trispinosus* ao longo da costa brasileira através de censos visuais,

revelou que as menores abundâncias de *S. trispinosus* foram registradas no estado de Pernambuco, enquanto os menores tamanhos médios registrados ocorreram em Porto Seguro (Hackradt et al., 2017, dados não publicados). Adicionalmente, o monitoramento dos portos pesqueiros de Porto Seguro revela que a importância relativa de *S. trispinosus* no desembarque pesqueiro está entre 8,5 e 21% da captura total, e são oriundos principalmente da pesca de arpão, indicando a forte presença da pressão pesqueira sobre a espécie na região (DallOrto et al., 2016; Sena et al., 2016).

Diversos estudos teóricos e empíricos têm demonstrado o efeito da pesca sobre a perda de diversidade genética em várias espécies de peixes explorados comercialmente (Smith et al., 1991; Hauser et al., 2002). Em especial, Pinsky e Palumbi (2014), em uma meta-análise com 72 espécies de peixes sobre-explotados, forneceram evidências de que a sobrepesca reduz a diversidade genética nessas populações. Apesar de não ser do escopo deste trabalho responder sobre o papel da pesca na perda de variabilidade genética do budião azul, podemos inferir que a continuidade da pressão pesqueira sobre *S. trispinosus* poderá levar à diminuição do tamanho efetivo da população, como já evidenciado por Previero e colaboradores (2014), e conseqüentemente à uma maior perda de alelos importantes (Allendorf et al., 2014), reduzindo a resiliência da população frente a mudanças, como por exemplo, em face ao cenário de rápidas mudanças climáticas mundiais.

A ausência de unidades genéticas distintas dentro das localidades amostradas foi testada através do PCoA e da abordagem bayesiana, e confirmada pela AMOVA, que demonstrou que a maior parte da variabilidade genética se dá entre os indivíduos em suas localidades. Pressupõe-se que o alto fluxo gênico observado esteja relacionado muito provavelmente a dispersão do estágio larval ainda desconhecido e as características oceanográficas na costa brasileira. A principal corrente oceanográfica atuante na costa brasileira é a corrente do Brasil (BC), que leva água quente da região equatorial até a divisa com a Argentina, onde se encontra com a corrente das Malvinas, de sentido contrário e com águas mais frias (Ekau & Knoppers, 1998). Em menor escala atuam as correntes originadas pelos ventos que se caracterizam pela dominância dos ventos NE, N e E durante o verão, e dos ventos S e SE no inverno, característicos da região Nordeste do Brasil (Lira et al., 2010). Devido a sua grande extensão a BC pode ser responsável pela homogeneidade genética observada nas amostras coletadas ao longo de aproximadamente 2000 km de costa (Figura 4), sendo as correntes locais

importantes para a manutenção do fluxo gênico a escala local e regional, proporcionando a distribuição larval entre os sistemas recifais adjacentes.



Figura 4. Mapa mostrando o padrão de conectividade genética estabelecido através dos valores de F_{ST} das amostras de *Scarus trispinosus*. Todos os valores de F_{ST} foram representados.

Outros trabalhos que investigaram a estrutura genética de espécies de peixes marinhos brasileiras foram igualmente incapazes de detectar diferenças significativas entre as populações ao longo da costa brasileira (*Scomberomorus cavalla*, Santa Brígida et al., 2007; *Ocyurus chrysurus*, Vasconcellos et al., 2008, Silva et al., 2015; *Chaetodon striatus* e *Pomacanthus paru*, Afonso e Galetti 2007), entre a costa e ilhas oceânicas (*Acanthurus chirurgus*, Rocha et al., 2002; *Cephalopholis fulva*, Freitas et al., 2003, Souza et al., 2015), utilizando marcadores mitocondriais em lutjanídeos (Pereira, 2016; Dias Junior et al., 2012) e mesmo temporalmente ao longo dos anos (*Cynoscion acoupa*, Rodrigues et al., 2008). No entanto, alguns trabalhos evidenciaram diferenças entre as populações brasileiras e caribenhas (*Acanthurus bahianus* e *Acanthurus coeruleus*, Rocha et al., 2002; *Ocyurus chrysurus*, Vasconcellos et al., 2008), também entre as porções tropical e subtropical da costa do Brasil (*Macrodon ancylodon*, Santos

et al., 2006; *Chaetodipterus faber*, Machado et al., 2017), e subestruturação populacional no Atlântico Oeste (*Epinephelus itajara*, Craig et al., 2009).

Similarmente a este estudo, a maioria dos estudos citados acima explicam a homogeneidade genética das espécies estudadas através dos longos estágios larvais, como p.ex. de Acanthurídeos, 45-70 dias (Rocha et al., 2002; Freitas et al., 2003; Santa Brígida et al., 2007), ou pelas preferências de habitats dos adultos (Rocha et al., 2002), a alta mobilidade dos mesmos (Santa Brígida et al., 2007; Silva et al., 2015) e as correntes costeiras atuantes (Freitas et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008; Silva et al., 2015). Por outro lado, as principais barreiras ao fluxo gênico mencionadas foram a foz do rio Amazonas, que separa a fauna do Caribe da brasileira (Rocha et al., 2002; Machado et al., 2017), e fatores ecológicos associados a distintas pressões seletivas locais (Afonso e Galetti, 2007).

Pouco se sabe sobre as habilidades de dispersão pelágica de larvas de peixes-papagaios, em especial a nossa espécie de interesse, *S. trispinosus*. No entanto um estudo realizado por Victor (1998) com juvenis de *Sparisoma viride* e *Sparisoma radians*, no Panamá, revelou que ambas as espécies possuem longos estágios pelágicos. A média estimada de duração do estágio pelágico (PLD) para *S. viride* foi de 57 dias (intervalo 47-80) enquanto *S. radians* teve uma média de 60 dias (intervalo 50-93). As estimativas relativamente longas de duração pelágica destas larvas podem explicar a propensão da família para atravessar longas distâncias. No entanto, são necessários estudos que foquem na identificação das larvas de *S. trispinosus* para avaliar o potencial dispersor da espécie e sua influência nos padrões de conectividade encontrados. Além disso, a pressão pesqueira visando os indivíduos maiores também pode afetar o *output* larval e a conectividade entre as populações, já que a fecundidade das espécies de peixes tende a aumentar com o tamanho corporal (Birkeland e Dayton, 2005).

Outro fator ambiental além das correntes oceânicas, é a continuidade do habitat coralíneo que se estende pelo litoral nordeste brasileiro propiciando um corredor para adultos e juvenis, funcionando como facilitadores ao fluxo gênico (Mora; Sale, 2002; Palumbi, 1992; Weersing; Toonen, 2009). Entretanto, segundo estudos que avaliaram a movimentação de várias espécies de Scaridae (Howard et al., 2003), em especial do gênero *Scarus*, demonstram que a máxima área de vida calculada foi de aproximadamente 43.000 m² para *Scarus rivulatus* (Welsh e Bellwood 2012), enquanto que *S. rubroviolaceus* apresentou alta taxa de fidelidade ao habitat e áreas de vida de 2.500 m² (Ong 2007). Tais indicações sugerem uma alta capacidade de homogeneização

gênica, porém limitada a escala regional, indicando que outros processos que atuem em grandes escalas espaciais estejam influenciando.

Recentemente, numerosos marcadores de microssatélites foram identificados para espécies ameaçadas de extinção que podem servir como ferramentas úteis que ajudem a criar uma imagem mais precisa dos padrões e processos atuantes em espécies em perigo (DeSalle e Amato, 2004). Análises do atual estado populacional de uma espécie em perigo de extinção podem servir de base para programas de manejo e recuperação das mesmas, indicando locais que por albergarem maior diversidade genética podem ser utilizados como fontes de indivíduos para programas de repovoamento, por exemplo (Lopera-Barrero et al., 2013). Em nosso estudo de caso, a ausência de estrutura genética indica que localidades depauperadas geneticamente podem ser manejadas com a finalidade de incrementar a diversidade genética a fim de recuperar as populações locais conferindo a elas maior resiliência. No entanto, é importante que marcadores moleculares específicos sejam desenvolvidos e mais estudos sejam realizados em vistas a conservação desta espécie ameaçada.

Assim, as evidências conjuntas indicam quão importantes são os dados genéticos para diagnosticar os níveis de variação genética, bem como sua distribuição espacial ao longo da área geográfica de uma espécie ameaçada de extinção. Adicionalmente, tais dados permitem o gerenciamento racional e aplicação dos mesmos em planos de conservação focando na recuperação de espécies de peixes ameaçadas de extinção como é o caso do budião azul.

5. REFERÊNCIAS

Affonso, P.R.A.M., Galetti Jr., P.M., 2007. Genetic diversity of three ornamental reef fishes (Families Pomacanthidae and Chaetodontidae) from the Brazilian coast. *Brazilian Journal of Biology*. 67 (4), 925–933.

Allendorf, F.W., Berry, O., Ryman, N., 2014. So long to genetic diversity, and thanks for all the fish. *Molecular Ecology*. 23, 23–25.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996 e 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.

Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France

Bernardi, G., 2011. Monophyletic origin of brood care in damselfishes. *Molecular phylogenetics and evolution*. 59, 245–8.

Birkeland, C., Dayton, P.K., 2005. The importance in fishery management of leaving the big ones. *Trends Ecology Evolution*. 20: 356–358.

Carlson, D. B. e Lippé, C., 2007. Isolation and characterization of 17 new microsatellite markers for the ember parrotfish *Scarus rubroviolaceus*, and cross-amplification in four other parrotfish species. *Molecular Ecology Notes*. 7, 613–616.

Choat, W.T., Krehbiel, C.R., Brown, M.S., Duff, G.C., Walker, D.A., Gill, D.R., 2002. Effects of restricted versus conventional dietary adaptation on feedlot performance, carcass characteristics, site and extent of digestion, digesta kinetics, and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*. 80 (10), 2726-2739.

Cockerham, C. C.; Weir, B. S., 1984. Co-variances of relatives stemming from a population undergoing mixed, self and random mating. *Biometrics*. 40, 157-164.

Coleman, F. C., Koenig, C. C., Huntsman, G. R., Musick, J. A., Eklund, A. M., McGovern, J. C., Chapman, R. W., Sedberry, G. R, Grimes, C. B., 2000. Long-lived reef fishes: the grouper-snapper complex. *Fisheries (Bethesda)*. 25, 14 – 21.

Comeros-Raynal, M. T., Choat, J. H., Polidoro, B. A., Clements, K. D., Abesamis, R., Craig, M. T., 2012. The Likelihood of Extinction of Iconic and Dominant Herbivores and Detritivores of Coral Reefs: The Parrotfishes and Surgeonfishes. *PLoS ONE*. 7 (7).

Conrad, D.F., Hurler, M.E., 2007. The population genetics of structural variation. *Nature Genetics (Suppl.)*. 39, 30e 36.

Cowen, R.K., Paris, C.B., Srinivasan, A., 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*. 311, 522 e 527.

Cowen, R.K., Gawarkiewicz, G., Pineda, J., Thorrold, S.R., Werner, F.E., 2007. Population connectivity in marine systems. *Oceanography*. 20, 14 - 21.

Craig, M. T., Graham, R. T., Torres, R. A., Hyde, J. R., Freitas, M. O., Ferreira, B. P., Hostim-Silva, M., Gerhardinger, L. C., Bertoni, A. A., Robertson, D. R., 2009. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*. 7, 167–174.

Craig, M.T., Sadovy de Mitcheson, Y.J., Heemstra, P.C., 2011. Groupers of the World: A Field and Market Guide. NISC/IUCN, 356.

Dayanandan, S., Rajora, O. P., Bawa, K. S., 1998. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics*. 96 (6), 950–956.

DeSalle, R. e Amato, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Review Genetics*. 5, 702-712.

Dias Junior, E. A. e Molina, W. F., 2012. Estrutura genética populacional de *Lutjanus analis* – cioba e *Lutjanus jocu* – dentão (Lutjanidae) ao longo do litoral brasileiro. 2012. 95 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Earl, D.A., VonHoldt, B.M., 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4, 359 - 361.

Ekau, W., Knoppers, B., 1998. An introduction to the pelagic system of the Northeast and East Brazilian shelf. *Archive of Fishery and Marine Research*. 47, 5–24.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14, 2611 - 2620.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial - DNA restriction data. *Genetics* 131, 479 e 491.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0, an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 1, 47 – 50.

Félix-Hackradt, F.C., Hackradt, C.W., Pérez-Ruzafa, Á., García-Chartron J.A., 2013. Discordant patterns of genetic connectivity between two sympatric species, *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758) e *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758), in southwestern Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*. 92, 23 - 34.

Ferreira, C. E. L., Gonçalves, J. E. A., Coutinho, R., 2001. Community structure of fishes and habitat complexity on a tropical rocky shore. *Environmental Biology Fishes*. 61, 353–369.

Floeter, S.R., Behrens, M.D., Ferreira, C.E.L., Paddock, M.J., Horn, M.H., 2005. Geographical gradients of marine herbivorous fishes: patterns and processes. *Marine Biology*. 147, 1435–1447.

Francini-Filho, R.B., Moura, R.L., 2008. Dynamics of fish assemblages on coral reefs subjected to different management regimes in the Abrolhos Bank, eastern Brazil. *Aquatic Conservation and Marine and Freshwater Ecosystem*. 18, 1166-1179.

Freeland, J.R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley e Sons Ltd, West Sussex.

Freitas, J. E. P., Araújo, M. E. A., Solé-Cava, A. M., 2003. Estruturação genética das populações de duas espécies de peixes recifais do Atol das Rocas e da costa do Ceará. *Tropical Oceanography*. 31 (2), 171–180.

Frydl, P., Stearn, C.W., 1978. Rate of bioerosion by parrotfish in Barbados reef environments. *New York: Academic Press J Sedim Petrol*. 48, 1149–1158.

Goudet, J., 2002. Fstat Version 2.9.3.2. A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat>.

Gramacho, K. P., Risterucci, A. M., Lanaud, C., Lima, L. S., Lopes, U. V., 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Molecular Ecology Notes*, Oxford. 7:1, 153-155.

Hackradt, C. W. 2017. Amostragem em projeto de pesquisa. Dados não publicados.

Hauser, L., Adcock, G. J., Smith, P. J., Ramirez, J. H. B., Carvalho, G. R., 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). Proceedings of the National Academy of Sciences. 99 (18), 11742 – 11747.

Hauser, L., Carvalho, G., 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. Fish. 9, 333 e 362.

Hoey e Bellwood, 2008. Cross-shelf variation in the role of parrotfishes on the Great Barrier Reef. Coral Reefs. 27 (1), 37–47.

Leão, Z.M.A.N., Dominguez, J.M.L., 2000. The tropical coast of Brazil. Marine Pollution Bulletin. 41, 112-122.

Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P., Oliveira, M.D.M., Vasconcellos, V., 2010. Status of Eastern Brazilian coral reefs in time of climate changes. Pan-American Journal of Aquatic Sciences. 5(2), 224-235.

Leis, J. M., McCormick, M. I., 2002. The biology, behavior, and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes. In: Sale, P. F. (editor). Coral reef fishes: dynamics and diversity in a complex ecosystem. Academic Press: San Diego. 171-199.

Lewis, S. M. e Wainwright, P., 1985. Herbivore abundance and grazing intensity on a Caribbean coral reef. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 87, 215-228.

Lira, L., Wor, C., Hazin, F. H. V., Braga Júnior, H. A. C., Pacheco dos Santos, J. C., 2010. Study of marine currents by the utilization of drift cards off Pernambuco State, Brazil. Arquivo de Ciências do Mar. 43(1), 30 – 37.

Lopera-Barrero, N., Povh, J., Fornari, D. C., Rodriguez-Rodriguez, M., dos Santos, S. C. A., Ribeiro, R., 2013. Genetic diversity of *Prochilodus lineatus* stocks using in the stocking program of Tietê River, Brazil. Revista MVZ Córdoba. 18(3), 3759 - 3766.

Machado, L. F., Damasceno, J. S., Bertoncini, A. A., Tosta, V. C., Farro, A. P. C., Hostim-Silva, M., Oliveira, C., 2017. Population genetic structure and demographic history of the spadefish, *Chaetodipterus faber* (Ephippidae) from Southwestern Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 487, 45–52.

Marchioro, G. B. e Nunes, M. A., 2003. Avaliação de Impactos da Exploração e Produção de Hidrocarbonetos no Banco dos Abrolhos e Adjacências (G.F. Dutra e R.L. Moura, eds.). Conservation International Brasil, Instituto Baleia Jubarte, Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental, BirdLife Brasil, Sociedade Brasileira de Estudos de Recifes de Coral e Fundação SOS Mata Atlântica. Caravelas. 119 p.

Martínez-Cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J.J., O'Brien, S., Jand Johnson, W. E., 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes*. 2, 323-326.

Moore, S. S., Sargeant, L.L., King, T.J., Mattick, J.S., Georges, M., Hetzel, D.J., 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 10, 654 - 660.

Mora, C. and Sale, P. F., 2002. Are populations of coral reef fish open or closed? *Trends in Ecology and Evolution*. 17 (9).

Moura, R.L., Figueiredo, J.L., Sazima, I., 2001. A new parrotfish (Scaridae) from Brazil, and revalidation of *Sparisoma amplum* (Ranzani, 1842), *Sparisoma frondosum* (Agassiz, 1831), *Sparisoma axillare* (Steindachner, 1878) and *Scarus trispinosus* Valenciennes, 1840. *Bulletin of Marine Science*. 68, 505-524.

Ogden, J.C., e Buckman, N.S., 1973. Movements, foraging groups, and diurnal migrations of the striped parrotfish *Scarus croicensis* Bloch (Scaridae). *Ecology*. 54, 589-596.

Ong, L., 2007. The ecological importance of parrotfish as bioeroders and sediment producers and their conservation within small marine protected areas. *Dissertação*. University of Hawaii. Manoa, Honolulu.

- Palumbi, S. R., 1992. Marine speciation on a small planet. *TREE*. 7, 4.
- Peakall, R. e Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28, 2537-2539.
- Pereira, L.L. Genética populacional do ariocó *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) na costa brasileira. 2016. 26 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 2016.
- Pérez-Ruzafa, Á., Gonzalez-Wangüemert, M., Lenfant, P., Marcos, C., Garcia-Charton, J.A., 2006. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biological Conservation*. 129, 244 e 255.
- Pinsky, M. L., Palumbi, S. R., 2014. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*. 23, 29 – 39.
- Previero, M., 2014. A pesca do budião-azul (*Scarus trispinosus* Valenciennes, 1840) no maior complexo coralíneo do Atlântico Sul. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.
- Primmer, C. R., Moller, A.P., Ellegren, H., 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*. 5, 365-378.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155, 945 e 959.
- Rocha, L. A., Bass, A. L., Robertson, D. R., Bowen, B. W., 2002. Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic Surgefishes (Teleostei: Acanthuridae). *Molecular Ecology*. 11, 243 - 252.
- Rodrigues, R., Schneider, H., Santos, S., Vallinoto, M., Sain-Paul, U., Sampaio, I., 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 31 (2) 487-492.
- Sale, P.F., 1980. Assemblages of fish on patch reefs—predictable or unpredictable? *Environmental Biology Fish*. 5, 243–49

Sadovy, Y. 2001. The threat of fishing to highly fecund fishes. *Journal of Fish Biology*. 59A,90–108.

Saenz-Agudelo, P., Jones, G.P., Thorrold, S.R., Planes, S., 2009. Estimating connectivity in marine populations: an empirical evaluation of assignment test and parentage analysis under different gene flow scenarios. *Molecular Ecology*. 18, 1765 e 1776.

Santa Brígida, E. L., Cunha, D. B., Rego, P. S., Sampaio, I., Schneider, H., Vallinoto, M., 2007. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *Brazilian Journal. Biology*. 67(4), 919-924.

Santos, S., Hrbek, T., Farias, I. P., Schneider, H., Sampaio, I., 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology*. 15, 4361–4373.

Selkoe, K.A., Henzler, C.M., Gaines, S.D., 2008. Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. *Fish and Fisheries*. 9 (4), 363 - 377.

Silva, R., Veneza, I., Sampaio, I., Araripe, J., Schneider, H., Gomes, G., 2015. High Levels of Genetic Connectivity among Populations of Yellowtail Snapper, *Ocyurus chrysurus* (Lutjanidae – Perciformes), in the Western South Atlantic Revealed through Multilocus Analysis. *PLoS ONE*. 10 (3).

Smith, P.J., Francis, R.I.C.C. and McVeagh, M., 1991. Loss of genetic diversity due to fishing pressure. *Fisheries Research*, London 10, 309-3 16.

Souza, A. S., Dias Júnior, E. A., Galetti Jr., P. M., Machado, E. G., Pichorim, M. e Molina, W. F., 2015. Wide-range genetic connectivity of Coney, *Cephalopholis fulva* (Epinephelidae), through oceanic islands and continental Brazilian coast. *Academia Brasileira de Ciência*. 87 (1).

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P.F., 2004. Micro-Checker: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 535-538.

Vasconcellos, A. V., Vianna, P., Paiva, P. C., Schama, R., Solé-Cava, A., 2008. Genetic and morphometric differences between yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*, Lutjanidae) populations of the tropical West Atlantic. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1), 308-316.

Victor, B. C., 1998. Duration of the planktonic larval stage of one hundred species of Pacific and Atlantic wrasses (family Labridae). *Marine Biology*. 90, 317-326.

Victor, B.C., 1991. Settlement strategies and biogeography of reef fishes. *The ecology of fishes on coral reefs*. Academic Press. 231–260.

Vital, H., Silveira, I. M., Amaro, V. E., 2005. Carta sedimentológica da plataforma continental brasileira - área Guamaré a Macau (NE Brasil), utilizando integração de dados geológicos e sensoriamento remoto. *Revista Brasileira de Geofísica*. 23 (3).

Weersing, K. A., Toonen, R. J., 2008. Population genetics, larval dispersal, and demographic connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*. 393, 1 – 12.

Welsh, J. Q. and Bellwood, D. R., 2012. How far do schools of roving herbivores rove? A case study using *Scarus rivulatus*. *Coral Reefs*. 31, 991–1003

Wright, S., 1949. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15, 323–354.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Ferramentas moleculares como os microssatélites devem ser consideradas fundamentais para programas de conservação, especialmente quando se trata de espécies que se encontram em algum tipo de ameaça, pois permitem a compreensão da conectividade genética das populações e o estabelecimento de planos de manejo adequados para cada espécie.

A amplificação cruzada entre as espécies congêneres testadas (*Scarus rubroviolaceus* – *Scarus trispinosus*) apresentou uma baixa taxa de transferência (30%). Adicionalmente, as espécies de mesma família, porém de gêneros diferentes apresentaram taxas de transferibilidade superiores.

Apesar da limitação no número de microssatélites obtidos, foi possível observar que *Scarus trispinosus* apresentou somente uma população ao longo da costa brasileira, e que a área onde está inserida a região do Banco dos Abrolhos (Corumbau e Caravelas) apresentaram as maiores taxas de variabilidade genética. Em contrapartida, foi sugerido que em função da intensa pressão pesqueira em Porto Seguro e Pernambuco, essas duas localidades apresentaram as menores taxas de diversidade genética.

A ausência de estrutura populacional é inferida principalmente em função do longo estágio larval apresentado em estudos com espécies da subfamília Scarinae e das correntes oceânicas brasileiras que agem homogeneizando as populações marinhas.

No entanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de marcadores específicos para o budião azul, para que seja possível um maior entendimento sobre aspectos populacionais e sua relação de parentesco com as demais espécies da família. Considerando tais evidências é possível orientar planos de manejo e conservação para *S. trispinosus* a fim de manter a integridade genética e evolutiva da população na costa brasileira.