



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
Departamento de Oceanografia e Ecologia (DOC / UFES)
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL

**Ecologia e Genética da Conservação de Meros (*Ephinephelus itajara*)
(Serranidae: Epinephelinae)**

Júnio Damasceno de Souza

Aracruz, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
Departamento de Oceanografia e Ecologia (DOC / UFES)
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental



Ecologia e Genética da Conservação de Meros (*Ephinephelus itajara*) (Serranidae: Epinephelinae)

Júnio Damasceno de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

Orientador:

Prof. Dr. Maurício Hostim Silva

Co-orientadora:

Profa. Dra. Ana Paula Cazerta Farro

**Ecologia e Genética da Conservação de Meros (*Ephinephelus itajara*)
(Serranidae: Epinephelinae)**

Júnio Damasceno de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Hostim Silva – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo/UFES

Prof. Dr. Agnaldo Silva Martins – Examinador Interno
Universidade Federal do Espírito Santo/UFES

Prof. Dra. Bianca Bentes da Silva – Examinadora Externa
Universidade Federal do Pará/UFPA

Prof. Dr. Fábio Porto Foresti – Examinador Externo
Universidade Estadual Paulista/UNESP

Prof. Dra. Gláucia Caroline Silva de Oliveira – Examinadora Externa
Universidade Federal do Pará/UFPA

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a vida e a capacidade de realizar tudo que acreditei ser capaz de fazer e me manter ao lado da família e de pessoas boas que sempre me ajudaram em cada detalhe. Pelas inúmeras vezes que pedi para me manter atento, calmo e proteção nas estradas.

À Família; meus Pais, meus irmãos Renato, Ricardo e minha irmã Juliana meus melhores amigos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado nos anos difíceis da profissão e o maior estímulo na missão de retorno para Belo Horizonte. Aos amigos e familiares Adriana, Marinete e Maurício e à nossa nova geração Gabriel, Lucas, Rafael, Miguel, Júlia e Felipe.

À Carla; minha esposa pelo apoio, carinho e a compreensão em todos os momentos. Por caminhar ao meu lado nas decisões e aos nossos filhos Miguel e Felipe, nossa maior felicidade e a maior de todas nossas conquistas e que nos faz sorrir todos os dias.

Ao meu amigo Arthur e toda sua família; Roberto, Rosa, Henrique, Ana Luiza, Saerli, Heitor, Rúbia, Guiomar, Romildo, Edimar e tantos outros parentes que tive o prazer de conhecer. Pelo acolhimento, amizade, confiança e tantos momentos de alegria que me fizeram sentir como parte da família e fizeram de Conceição da Barra uma cidade muito mais agradável.

A Joana Damasceno (Joaninha) e Família pelo carinho e atenção, especialmente pela preocupação e o gesto de apoio. E agradecimento especial também a Inês Damasceno (Tinês) pelo carinho, atenção e amizade.

Aos pescadores e amigos de Conceição da Barra que me ensinaram muitas coisas e possibilitaram a caminhada deste trabalho, especialmente aos pescadores Romildo, Nador e Bininho. De forma mais especial à pescadora Delma; batalhadora, humilde e maior colaboradora nas pesquisas conduzidas no manguezal com os meros juvenis.

Ao Sr. Milton e Dona Vera pela atenção, carinho e toda preocupação em manter um ambiente muito agradável no condomínio de moradia da quitinete em Conceição da Barra.

Ao Flávio Koch pela amizade e o companheirismo em Vitória e Conceição da Barra e o carinho da família; Dona Rita, Sr. Olendino e Camila. Pelas alegrias, longas conversas, tour em Vitória e compartilhar também de suas alegrias e conquistas no noivado, mestrado e doutorado e o casamento.

À Mônica Amorim; pela amizade, carinho e atenção de toda família; seus pais, irmãos e da Victoria, durante esses anos de doutorado que estive nas idas e vindas de Vitória para Belo Horizonte e me receberam sempre de braços abertos. Pelo cafezinho, pão de queijo e boa prosa.

Aos amigos Leonardo e Orjana; amigos de papo, amigos de praia, amigos de prato, amigos de profissão, amigos no stress, amigos no Espírito Santo, amigos em São Paulo, amigos em Santa Catarina, amigos em Minas Gerais.

Ao Lougan companheiro das missões e milhões de dúvidas genéticas no laboratório da UFES em São Mateus. Pela dedicação como aluno, pelos ensinamentos no quebra cabeça do laboratório, pela companhia nas conversas filosóficas e no almoço sem fins.

A Raquel companheira de bancada no laboratório da UNESP pela atenção, paciência e amizade. Pelos conhecimentos sólidos na genética que me deram confiança na capacidade de superar as dificuldades e quem mais contribuiu para meu aprendizado na genética.

Aos amigos de sempre Flávio Chaves, Érica Baleroni, Elisângela Dantas, Cleide Rezende e Waldo Troy pela atenção e principalmente compreensão.

Aos profissionais e colegas do PPGOAM/UFES que contribuíram para minha formação profissional e ofereceram condições plenas para o desenvolvimento desta pesquisa, especialmente os professores docentes, Luciano Elia, Leonardo Bueno, Camila Murad, Michele Toniato, Ryan Andrades, Bruno Ferreira, Mônica Amorim, Alexandre Cassuga e Raphael Macieira.

Aos profissionais e colegas do CEUNES/UFES, especialmente da Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical onde desenvolvi parte dos meus estudos e contei com a colaboração e apoio, especialmente Julien Chiquieri, Maurício Hostim, Ana Paula Farro, Roberta Paresque, Luiz F. Duboc, Drienne Messa, Rodrigo Silva, Michelle Bolzan, Juliana Ceolin, Renata Torezani, Rayane Batalha, Flora Zauli.

Aos profissionais e colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes na UNESP pelo ambiente de trabalho, pelo apoio na solução dos problemas, pela atenção, respeito e tantos momentos de descontração durante o ano que estive em Botucatu. Agradeço especialmente ao Cláudio, Raquel, Cristiane (Cris), Gabriel (Pink), Ricardo Britzke, Fábio (Fio), Jefferson (Menudo), Gleisy, Bruno (Guiodai), Bruno Melo, Luiz (Japa), Daniela (Dani), Fernando Yuldi, Fernando (Konrado), Vanessa, Guilherme (Varvito), Renato, Érica e Christian.

A Ana Paula Farro pela co-orientação na pesquisa, pela atenção e disponibilidade para discussão das análises e direcionamentos essenciais para o trabalho.

Ao Cláudio Oliveira pela disponibilidade, colaboração científica, confiança e oferecer condições para o desenvolvimento deste trabalho e proporcionar um ambiente de trabalho interativo entre vários profissionais.

Ao Maurício Hostim por ter aceitado a orientação deste trabalho e por todo empenho para proporcionar as melhores condições de trabalho. Pela disponibilidade na busca de soluções e profissionais que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. Estendo os agradecimentos à Vânia pelo carinho, acolhimento e atenção.

Aos Professores e Doutores que contribuíram fundamentalmente para o enriquecimento científico do trabalho e principais norteadores da pesquisa Henry Spach, Jean Joyeux, Luiz Fernando Duboc, Cristiano Albuquerque, Vander Tosta, Leonardo Machado, Fernando Mendonça e Cláudio Oliveira.

À Banca Examinadora da Tese pela disponibilidade e contribuições para meu processo de avaliação na defesa da Tese.

À Rede Meros e o Projeto Meros do Brasil pelo apoio técnico e busca de recursos para o desenvolvimento das pesquisas para conservação dos meros no Brasil, especialmente Bianca Bentes, Beatrice Padovani, Jonas Leite, Matheus Freitas, Paulo Beckecamp, Leonardo Bueno, Leonardo Machado e Fabiano Grecco.

À Jamile Beninca que contribuiu muito com as atividades de campo, pelo empenho dedicação e competência e especialmente pela amizade e compreensão.

Às empresas que investiram recursos financeiros fundamentais para a realização das pesquisas; Petrobrás (Programa Petrobrás Ambiental), Transpetro, FAPES, FAPESP e CNPq.

Aos gestores do IEMA e funcionários da APA de Conceição da Barra e do Parque Estadual de Itaúnas pelo empenho e dedicação para a realização das pesquisas nas unidades de conservação, principalmente do Parque Estadual de Itaúnas. Infelizmente fui obrigado a abandonar a proposta original do projeto de doutorado por problemas alheios à nossa vontade, mas não faltou incentivo de vocês, especialmente Fred, Gustavo, Gil, Caxeli e Tarciley.

Ao ICMBio pela eficiência e rapidez na emissão das licenças da coleta de dados pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade - SISBIO

Aos institutos Ecomar e Ekobé pela difícil missão de administrar recursos e garantir o andamento de múltiplas atividades de pesquisa e tanta diversidade de idéias e pensamentos, especialmente Paulo Beckcamp, Taiane Beckcamp, Vânia Roseli Alexandre, Michelly Bolzan e Rodrigo Araújo.

À CAPES pela bolsa de doutorado que foi essencial para dedicação exclusiva no desenvolvimento do trabalho durante 4 anos, sem a qual não teria realizado o doutorado.

A tantas outras pessoas que por um simples favor, gentileza e oração foram também fundamentais e me ajudaram nesta caminhada e certamente foram tão importantes quanto todos os agradecimentos que fiz nas linhas acima... Muito Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO DA TESE DE DOUTORADO.....	11
APRESENTAÇÃO GERAL	15
A subfamília Epinephelinae e as relações evolutivas de <i>Epinephelus itajara</i>	15
A biologia e aspectos reprodutivos de <i>Epinephelus itajara</i>	15
O conhecimento genético dos Epinephelinae no Atlântico	16
As ameaças e status de Conservação.....	17
Justificativa.....	18
OBJETIVO GERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
Capítulo 1: Uso do Habitat de Manguezal por Meros Juvenis (<i>Epinephelus itajara</i>).....	23
RESUMO	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
Pesquisa Bibliográfica da Subfamília Epinephelinae na Costa Oeste do Atlântico	25
Pesquisa de <i>Epinephelus itajara</i> Juvenis na APA de Conceição da Barra.....	25
Área de Estudo	25
Método de Coleta	25
Análise de Dados.....	26
RESULTADOS	27
Pesquisa Bibliográfica.....	27
Estudos de Levantamento da Ictiofauna em Ambientes Costeiros.....	27
Pesquisa Bibliográfica.....	28
A subfamília Epinephelinae na costa Oeste do Atlântico.....	28
Estudos de <i>Epinephelus itajara</i> Juvenis na APA de Conceição da Barra	30
Ecologia de Meros Juvenis em um Habitat de Manguezal.....	33
DISCUSSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
Capítulo 2: Estrutura Genética e História Populacional Inferida pela Análise das Sequências do DNA Mitochondrial de Atlantic Goliath Grouper (<i>Epinephelus itajara</i>).....	47
RESUMO	47
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	49

Coleta de Material	49
Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA	50
Alinhamento	51
Análises filogenéticas	51
Análise de estruturação e diversidade.....	51
Análise Filogeográfica.....	52
História Demográfica e Neutralidade	52
RESULTADOS	53
Composição Nucleotídica (Cyt <i>b</i>)	53
Composição Nucleotídica (D-Loop)	53
Variabilidade Populacional.....	55
Relacionamento Filogeográfico da População	55
Análise Filogenética	57
História Demográfica e Neutralidade	57
DISCUSSÃO	60
Variação Genética.....	60
Estrutura Populacional.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
Capítulo 3: Método genético para a identificação do mero <i>Epinephelus itajara</i> e oito espécies de peixes comerciais Epinephelinae), utilizando PCR multiplex.....	72
RESUMO	72
INTRODUÇÃO.....	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA	75
PCR-Multiplex	75
Análises	76
RESULTADOS	76
DISCUSSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CONCLUSÕES GERAIS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Valor Ecológico dos Habitats de Manguezal para os Meros Juvenis (<i>Epinephelus itajara</i>).....	23
Figura 1. Número de citações das espécies da subfamília Epinephelinae em diferentes habitats costeiros.	28
Figura 2. Províncias biogeográficas de distribuição das espécies da subfamília Epinephelinae no Atlântico. (Adaptado: Spalding <i>et al.</i> 2007).....	29
Figura 3. Relação do comprimento total (CT) com o comprimento padrão (CP) e o peso de <i>Epinephelus itajara</i> juvenis em habitat de manguezal na APA de Conceição da Barra entre novembro de 2011 a outubro de 2013.....	34
Figura 4. Captura mensal de <i>Epinephelus itajara</i> juvenis por armadilha (CPUE) em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição entre novembro de 2011 a outubro de 2013.....	35
Figura 5. Classes de tamanhos de <i>Epinephelus itajara</i> juvenis capturados em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição (ES) entre novembro de 2011 a outubro de 2013.	35
Figura 6. Box plot dos comprimentos totais (CT) em mm de <i>Epinephelus itajara</i> juvenis em quatro períodos temporais distintos em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição (ES) entre novembro de 2011 a outubro de 2013.	36
Capítulo 2: Estrutura Genética e História Populacional Inferida pela Análise das Sequências do DNA Mitocondrial de Atlantic Goliath Grouper (<i>Epinephelus itajara</i>)	47
Figura 1. Relacionamentos genéticos entre os haplótipos das sequências dos marcadores Cyt <i>b</i> e D-Loop das unidades populacionais de meros(<i>Epinephelus itajara</i>).....	54
Figura 2. Rede de haplótipos das regiões D-Loop e Cyt <i>b</i> do DNA mitocondrial para as distintas unidades populacionais de <i>Epinephelus itajara</i> na costa brasileira.....	58
Figura 3. Circulação das principais correntes oceânicas que atuam na região costeira do Atlântico Tropical Oeste e Caribe. (Adaptado: Rocha 2003).	63
Capítulo 3: Método genético para a identificação do mero <i>Epinephelus itajara</i> e oito espécies comerciais de garoupas (Epinephelinae) utilizando PCR multiplex	72
Figura 1. Dendrograma das espécies de peixes comerciais da subfamília Epinephelinae.	77
Figura 2. Resultado da eletroforese em gel em agarose com nove bandas de fragmentos das espécies de garoupas da subfamília Epinephelinae e a banda do COI universal com 655 bp.	79

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Valor Ecológico dos Habitats de Manguezal para os Meros Juvenis (<i>Epinephelus itajara</i>).....	23
Tabela I. Espécies da subfamília Epinephelinae com distribuição no Atlântico Tropical e Subtropical Oeste com dados comparativos dos limites de ocorrência, profundidade, comprimento máximo, grau de impacto da pesca e os habitats costeiros ocupados pelas espécies.	31
Tabela II. Estudos realizados sobre meros juvenis (<i>Epinephelus itajara</i>) abordando temas distintos na região da Flórida, Golfo do México, Caribe e no Brasil.	33
Capítulo 2: Estrutura Genética e História Populacional Inferida pela Análise das Sequências do DNA Mitocondrial de Atlantic Goliath Grouper (<i>Epinephelus itajara</i>).....	47
Tabela I. Número de exemplares (N) de <i>Epinephelus itajara</i> (mero) obtidos para cada localidade na costa brasileira.	50
Tabela II. Diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) intrapopulacionais para <i>Epinephelus itajara</i> pelos marcadores mitocondriais Cyt b (Citocromo Oxidase) e D-Loop (Região Controle).....	55
Tabela III. Distâncias genéticas das unidades populacionais e valores de p para os dados do F_{ST} de <i>Epinephelus itajara</i> na costa brasileira pelos marcadores Cyt b e D-Loop.....	56
Tabela IV. Análise da variância molecular (AMOVA) de <i>Epinephelus itajara</i> para Cyt b e D-Loop do DNA mitocondrial, com tres grupos populacionais: 1. Pará; 2. Bahia; 3. Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo e Santa Catarina.....	56
Tabela V. <i>Epinephelus itajara</i> . Parâmetros dos modelos de expansão espacial com as significâncias para cada unidade populacional. S: número de sítios polimórficos; θ_0 : tamanho populacional pré-expansão; θ_1 : tamanho populacional pós-expansão; τ : estimativa do tempo de expansão; SSD: soma dos desvios quadrados; rg : Índice de Raggedness.	59
Capítulo 3: Método genético para a identificação do mero <i>Epinephelus itajara</i> e oito espécies comerciais de garoupas (Epinephelinae) utilizando PCR multiplex	72
Tabela 1. Primers espécie-específicos desenvolvidos, tamanho dos fragmentos gerados e número de acesso das sequências no GenBank para nove espécies da subfamília Epinephelinae.	76
Tabela 2. Índices de divergência genética e desvio padrão para nove espécies da subfamília Epinephelinae pelo modelo de Kimura-2-parâmetros.....	78

RESUMO DA TESE DE DOUTORADO

Os peixes da subfamília Epinephelinae são estreitamente relacionados aos ambientes costeiros marinhos, especialmente habitats recifais. Dentre os Epinephelinae, os meros (*Epinephelus itajara*). Apresentam populações reduzidas pela pesca excessiva e tem sido seriamente ameaçado pela perda dos habitats de reprodução (recifes) e crescimento (manguezal), em todo seu limite de distribuição ao longo da costa tropical oeste do Atlântico. Filogeneticamente relacionadas a esta espécie encontram-se garoupas, badejos e chernes que atualmente são intensamente pescadas no Atlântico oeste e a espécie irmã *E. quinquefasciatus* do Pacífico Tropical Leste. A redução populacional das espécies trazem ameaças para conservação a longo prazo, devido a queda da capacidade reprodutiva pela captura seletiva de peixes de grande porte, perda da variabilidade e o fluxo genético que garantem a aptidão para adversidades ambientais e climáticas no tempo evolutivo. Apesar da legislação de proibição da pesca do mero em alguns países, a captura ilegal com a descaracterização morfológica é uma prática comum que dificulta ou impossibilita a identificação das espécies. A este respeito, técnicas moleculares têm fornecido ferramentas importantes para o monitoramento e fiscalização da pesca e se tornam essenciais na identificação forense de diversas espécies. O presente estudo investiga aspectos bioecológicos e genéticos dos meros visando adicionar informações para estratégias de conservação da espécie na costa brasileira. Como metas prioritárias foram desenvolvidas três linhas de pesquisa com a finalidade de determinar os aspectos biológicos e a frequência sazonal dos meros juvenis em habitat de manguezal em ambiente tropical; caracterização genética populacional dos meros em seis localidades na costa brasileira (Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina) pelos marcadores mitocondriais Cyt *b* e D-Loop, para avaliar os aspectos da diversidade, estrutura e fluxo genético das unidades populacionais e a elaboração de marcador molecular prático e de baixo custo para auxiliar na fiscalização e controle da pesca dos meros e outras oito espécies da subfamília Epinephelinae. O presente estudo identificou alta frequência de meros juvenis entre 100 e 300 mm, capturados ao longo de todos os meses do ano, com frequência significativamente maior no período que compreende a estação quente e chuvosa no Brasil tropical e com tamanhos significativamente maiores no período de transição entre o fim do verão e início do inverno (estação fria e seca). Estudos comparativos de meros juvenis em outros ambientes subtropicais sugerem que os manguezais podem ser habitats berçário e essenciais para os primeiros estágios de vida da espécie. Os resultados da genética populacional indicaram moderada a alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica provavelmente associada à colonização recente, com grande número de haplótipos raros predominantemente com passos mutacionais únicos. Os dados não revelaram estruturação populacional, no entanto, variação genética significativa para ambos os marcadores foi encontrada entre as unidades populacionais da Bahia com Espírito Santo apesar da proximidade geográfica, indicando a presença de barreira para o fluxo genético. Variações genéticas significativas pelo marcador D-Loop foram observadas entre o Pará e a Bahia em relação a maior parte das unidades populacionais. Não houve correlação significativa de divergências genéticas e a distância geográfica entre as unidades populacionais analisadas. O desenvolvimento de primers espécie-específicos, baseados no gene Citocromo Oxidase I

(COI), aplicados em PCR-Multiplex possibilitaram a identificação simultânea de nove espécies da subfamília Epinephelinae: *Epinephelus itajara*, *E. marginatus*, *E. morio*, *E. quinquefasciatus*, *Hyporthodus flavolimbatus*, *H. niveatus*, *Mycteroperca acutirostris*, *M. bonaci* e *M. microlepis*. Esta técnica poderá servir para o controle da pesca comercial e a identificação precisa do alvo de pesca visando a conservação das espécies. Apesar da necessária prudência na manutenção da proibição da pesca dos meros na costa brasileira, esta medida se tornará ineficaz se os habitats de manguezal e a conectividade com habitats recifais dos ciclos de vida das espécies ameaçadas não forem recuperados e protegidos integralmente. A conservação dos meros (*E. itajara*), a longo prazo, dependerá dos esforços para garantir a estabilidade demográfica e os eventos de dispersão e conectividade entre as populações que mantêm a variabilidade genética da espécie.

Palavras-chave

Epinephelus itajara – manguezal – genética de populações – genética forense – espécie ameaçada – marcadores mitocondriais – peixes recifais – ecossistemas costeiros

SUMMARY OF PhD THESIS

The fish subfamily Epinephelinae are highly related to marine coastal environments, especially reef habitats. Among Epinephelinae, Goliath grouper (*Epinephelus itajara*) populations have reduced by excessive fishing and has been severely threatened by loss of breeding habitats (reefs) and growth (mangrove) around its limit distribution along the west coast of the tropical Atlantic. Phylogenetically related to this species are groupers currently are intensively fished in the western Atlantic and the sister species *E. quinquefasciatus* the eastern tropical Pacific. Population reduction of threats to species conservation to bring long-term due to the decrease in the reproductive capacity by selective capture of large fish, loss of variability and gene flow that ensure suitability for environmental and climatic adversities in evolutionary time. Despite legislation prohibiting fishing for goliath groupers in some countries, illegal taking with morphological mischaracterization is a common practice that difficult or impossible to identify the species. In this respect, molecular techniques have provided important tools for monitoring and surveillance of fishing and become essential in forensic identification of several species. The present study investigates bio-ecological and genetic aspects of ooliath groupers aiming to add information to strategies for conservation of the species along the Brazilian coast. As priority targets three lines of research in order to determine the biological aspects and seasonal frequency of juveniles goliath grouper in mangrove habitat in tropical environments were developed; population genetic characterization of goliath grouper in six localities along the Brazilian coast (Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo and Santa Catarina) by mitochondrial markers Cyt *b* and control region, to assess the aspects of diversity, structure and gene flow of stocks and development of practical molecular marker and low cost to assist in monitoring and control of fishing and other eight groupers species of the subfamily Epinephelinae. This study identified a high frequency of juveniles under goliath groupers between 100 and 300 mm, which did not occur in the main studies in the literature with juveniles of the species. Catches were made throughout all months of the year, with significantly greater frequency in the period that includes the hot rainy season in tropical Brazil, with significantly larger sizes in the transition period between late summer and early winter (cold season and droughts). Comparative studies of juveniles goliath groupers in other subtropical environments suggest that mangroves can be an essential nursery habitat for early life stages of the species. The results of population genetics indicate moderate to high haplotype diversity and low nucleotide diversity probably associated with recent colonization, with large number of rare haplotypes predominantly single mutational steps. The data revealed no population structure, however, significant genetic variation for both markers was found between stocks of Bahia with the Espírito Santo despite the geographical proximity, indicating the presence of a barrier to gene flow. Significant genetic variations at control region were observed between Pará and Bahia compared to most stocks. There was no correlation significant genetic divergence and geographical distance between stocks analyzed. The development of species-specific primers based on the Cytochrome Oxidase I (COI), applied in multiplex PCR was enable the simultaneous identification of nine species of the subfamily Epinephelinae: *Epinephelus itajara*, *E. marginatus*, *E. morio*, *E. quinquefasciatus*, *Hyporthodus flavolimbatus*, *H. niveatus*,

Mycteroperca acutirostris, *M. bonaci* and *M. microlepis*. This technique can be used to control commercial fishing and precise identification of target fisheries for the conservation of the species. Despite the necessary prudence in maintaining the ban on fishing of goliath grouper in the Brazilian coast, the measure in the long run will become ineffective without the habitats of mangrove and reef habitats connectivity lifecycle of endangered species are not recovered and fully protected. The conservation of goliath grouper (*E. itajara*) the long term will depend on the efforts to ensure stability and the demographic events of dispersion and connectivity among populations that maintain genetic variability.

Keywords

Epinephelus itajara - mangrove - population genetics - forensic genetics - endangered species - mitochondrial markers - reef fish - coastal ecosystems

APRESENTAÇÃO GERAL

A subfamília Epinephelinae e as relações evolutivas de *Epinephelus itajara*

Os meros (*Epinephelus itajara* Lichtenstein, 1822) são membros da subfamília Epinephelinae (Teleostei: Serranidae) incluindo 159 espécies em 15 gêneros que compreendem os badejos (*Mycteroperca*), chernes (*Hyporthodus*), garoupas (*Epinephelus*), meros (Brasil: *E. itajara*; Portugal: *E. marginatus*; Pacífico Tropical Leste: *E. quinquefasciatus*) e piraúnas (*Cephalopholis*) (Heemstra e Randall 1993; Begossi *et al.* 2012).

A maior diversidade da subfamília Epinephelinae ocorre na região Indo Pacífico que provavelmente é a área ancestral de todos os Epinephelinae distribuídos por todo mundo, sendo o Atlântico colonizado em diferentes invasões na fauna americana (Smith 1971) e atualmente no Atlântico Oeste são reconhecidas 25 espécies da subfamília Epinephelinae em oito gêneros (Craig *et al.* 2012).

E. itajara, evolutivamente relacionada com *E. lanceolatus* do Indo Pacífico, deve ter se diferenciado no tempo à medida que alcançava a margem leste do Pacífico (Smith 1971). A relação entre fechamento no Istmo do Panamá durante o Plioceno (Coates *et al.* 1992) e o processo de especiação de *E. itajara* foi descartada com a descoberta de registro fóssil de *E. itajara* no final do Mioceno na bacia do Orinoco (Aguilera e Aguilera 2004). No entanto, o Istmo do Panamá provavelmente funcionou como barreira evolutiva no processo de especiação de *E. quinquefasciatus* que ocorre do Golfo da Califórnia ao Peru, leste tropical e subtropical do Pacífico, espécie filogeneticamente mais próxima de *E. itajara* (Heemstra e Randall 1993; Craig *et al.* 2009).

A biologia e aspectos reprodutivos de *Epinephelus itajara*

O mero é a maior das garoupas do Oceano Atlântico (> 400 kg). É encontrado em águas tropicais e subtropicais, relativamente rasas do Atlântico Oeste, da Flórida ao sul do Brasil, incluindo o Golfo do México e o Caribe e ao longo da costa oeste africana, do Congo ao Senegal (Heemstra e Randall, 1993). A espécie habita águas marinhas e salobras e está associada com substratos complexos e duros com recifes, saliências de rochas, fundos rochosos, faixas de manguezais e navios naufragados (Gerhardinger *et al.* 2006). Com preferência para abrigos cobertos, sendo raramente vistos muito distantes desses refúgios (Smith 1971).

Os Epinephelinae são espécies solitárias e generalistas de peixes, moluscos e crustáceos que se agrupam nas estações reprodutivas podendo localizar sítios de desova a centenas de quilômetros dos recifes (Heemstra e Randall 1993). Os meros *E. itajara* exibem alta fidelidade de local (Eklund e Schull 2001), porém, realizam migrações reprodutivas a longas distâncias (Piná-Amargós e González-Sansón 2009) para formar pequenas agregações (10 a 100 indivíduos) que são previsíveis no tempo e nas áreas específicas de desova (Colin *et al.* 1990; Sadovy e Eklund 1999). O modo de reprodução hermafrodita protogíneo de muitas espécies da subfamília (machos formados pela transformação sexual de fêmeas mais velhas, geralmente maiores e, portanto, menos abundantes que as fêmeas) tem implicações no manejo de pesca, uma vez que a pesca seletiva de adultos grandes direcionam a captura para machos em proporção maior que sua ocorrência nas populações locais (Heemstra e Randall 1993).

O ciclo de vida de *E. itajara* inclui mudanças ontogenéticas com as larvas marinhas pelágicas ocorrendo da zona costeira para ambientes mais rasos. A duração do período larval planctônico do mero pode variar entre 30 a 80 dias após a desova. Geralmente, a metamorfose ocorre entre 40 e 60 dias após a desova. O estabelecimento desta espécie no estuário, com sedimento lamoso e linha litorânea densamente coberta por *Rhizophora mangle* pode ocorrer com o comprimento médio de 14-15 mm e em qualquer fase lunar (Lara *et al.* 2009).

Os meros adultos ocorrem em recifes em profundidades menores que 50m, enquanto juvenis de *E. itajara* são bentônicos, ocupando estuários e linhas costeiras com manguezais (Eklund & Schull 2001). *E. itajara* juvenis estão associados principalmente às áreas de manguezais com alta complexidade espacial, no entanto, estes são ambientes ameaçados pelo processo de degradação e destruição por toda sua extensão nas regiões tropicais e subtropicais (Frias-Torres, 2006; Frias-Torres *et al.* 2007; Koenig *et al.* 2007). De uma perspectiva de conservação dos meros, tais locais são habitats mais importantes para necessidade de proteção, sendo considerados habitats essenciais e relacionados com alta abundância de meros adultos nas regiões costeiras associadas (Hostim-Silva *et al.* 2005; Frias-Torres 2006; Koenig *et al.* 2007).

A história de vida de *E. itajara* juvenis demonstra uma resposta direta no manejo aquático. A espécie provavelmente está limitada à qualidade de habitats disponíveis, portanto, mudanças no habitat poderiam refletir nas diferenças da distribuição e abundância dos meros (Eklund, 2005). Os hábitos de vida de *E. itajara*, com característica de crescimento lento, alta longevidade e baixa mortalidade natural, faz desta espécie altamente vulnerável à sobrepesca (Bullock *et al.* 1992).

O conhecimento genético dos Epinephelinae no Atlântico

O cenário de declínio da pesca comercial e a necessidade de garantir a conservação das espécies da subfamília Epinephelinae coincidem com os primeiros dados genéticos sobre garoupas, badejos e meros dos gêneros *Epinephelus* e *Mycteroperca* no Atlântico que surgiram no final da década de 1990 com os trabalhos de estrutura populacional com DNA mitocondrial (Richardson e Gold 1997; Gold e Richardson 1998), identificação de estoque de *E. striatus* e *M. microlepis* com DNA microssatélite (Stevenson *et al.* 1998; Chapman *et al.* 1999).

As informações e base de dados de caracterização genética e estrutura populacional para *Epinephelus*, *Mycteroperca* e outros Serranidae tiveram maior importância nos últimos 15 anos, a partir dos estudos de Ward *et al.* (2002), Carlin *et al.* (2003), Zatcoff *et al.* (2004) e Maggio *et al.* (2006).

Com os primeiros trabalhos, surgem os primeiros marcadores mais específicos para os serranídeos, principalmente pela necessidade crescente, de proteção das espécies ameaçadas pelas atividades da pesca intensiva. Zatcoff *et al.* (2002) desenvolveram marcadores microssatélites para avaliar a variação genética e estrutura populacional, com capacidade de amplificar DNA para *Mycteroperca bonaci*, *M. phenax*, *Epinephelus morio* e *E. itajara*.

Ramírez *et al.* (2006) seguindo a tendência conservacionista das espécies de garoupas ameaçadas, elaboram nove novos microssatélites para 16 espécies de serranídeos dentre elas, *E. itajara*. Craig e Hastings

(2007) fazem uma revisão na subfamília Epinephelinae (Serranidae) com base na filogenia molecular utilizando dois marcadores nucleares (Tmo-4C4 e Histonas H3) e dois marcadores mitocondriais (16S e 12S). Recentemente Torres *et al.* (2013) desenvolveram um estudo de genética forense para identificação de *E. itajara*, *E. marginatus*, *E. morio* e *M. bonaci* com PCR-RFLP e SNP's.

Com os marcadores moleculares mitocondriais e nuclear, Craig *et al* (2009) solucionam a hipótese de disjunção populacional dos meros do Atlântico e Pacífico. O estudo mostra um padrão consistente com a separação das populações em duas espécies; *Epinephelus itajara* (Atlântico) e *Epinephelus quinquefasciatus* (Pacífico).

Nesse contexto começam a surgir também modelos com a finalidade de entender os processos de dispersão larval e elaborar propostas para criação de unidades de conservação (Palumbi 1994; Hellberg *et al.* 2002; Maggio *et al.* 2005; Galindo *et al.* 2006; Weersing e Toonen 2009 e Portnoy *et al.* 2013). Esses modelos se baseavam na genética de população abordando principalmente os processos de dispersão, conectividade e isolamento das populações de Epinephelinae.

No Brasil, os primeiros registros de estudos genéticos apareceram nos últimos cinco anos, com dados básicos sobre o status de conservação e diversidade genética ao longo da distribuição da espécie na costa brasileira. Silva-Oliveira *et al.* (2008) realizaram estudos de variabilidade genética de populações de meros na região norte e nordeste do Brasil a partir da análise da região controle D-loop do DNA mitocondrial. Os dados revelaram baixa diversidade dos grupos populacionais localizados em regiões do Pará, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte sugerindo que a pressão de pesca e destruição dos habitats podem ser os principais fatores da baixa diversidade encontrada.

A diversidade genética e dados populacionais tiveram um incremento de dados a partir dos dados de Benevides (2011) que propõe uma estrutura populacional com base em marcador de DNA mitocondrial (Cyt *b*) e marcador nuclear (ISSR) com exemplares de diferentes áreas geográficas. Os resultados revelaram alta diversidade global e moderada diversidade local, porém, encontra alta diversidade no grupo com distribuição mais ao sul e sugere isolamento genético com as demais localidades. O estudo discute sobre forte tendência à estruturação evolutiva a nível global e regional com descontinuidade filogenética e separação da população de Santa Catarina. Os diferentes marcadores apresentaram estruturação populacional distinta, sendo o marcador nuclear separando uma população em Santa Catarina e o marcador mitocondrial separando uma população no Rio Grande do Norte.

As ameaças e status de Conservação

E. itajara tem interesse significativo na pesca comercial e recreativa. Desde a década de 70 as atividades de pesca têm demonstrado o declínio da captura por unidade de esforço e a diminuição no crescimento e recrutamento de novos indivíduos em alguns locais devido à sobrepesca. Em 1990 o governo dos Estados Unidos proíbe a captura dos meros em toda a extensão da Zona Econômica Exclusiva Americana devido o fim da pesca comercial na década de 1980 (Sadovy e Eklund, 1999).

A combinação entre o aumento na exploração e a susceptibilidade para o colapso das populações de garoupas (Epinephelinae), decorrente da sobrepesca, tem exigido medidas urgentes para conservação e manejo em uma abordagem sócio econômica para os ambientes marinhos (Morris *et al.* 2000).

No Brasil, como na maior parte do mundo, os grandes meros se encontram sob ameaça, com populações decrescentes, resultado da pressão pesqueira e a degradação do habitat (Ferreira *et al.* 2006). A lista da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) apresenta *E. itajara* como uma espécie criticamente ameaçada (IUCN 2013). Os meros são criticamente ameaçados, segundo a IUCN (2013) e no Brasil a espécie está inserida em uma portaria de proibição de pesca que iniciou em 2002 por cinco anos e foi renovada até 2012 (IBAMA, portaria nº 42 de 19 de setembro de 2007) pelo grau de impactos e dados indicando a redução dos meros adultos em recifes naturais e ambientes antropizados. Em 18 de setembro de 2012 a moratória de proibição de pesca, através da Instrução Normativa Interministerial 13/2012 do MMA/MPA, foi prorrogada até 2015. *E. itajara* foi o primeiro peixe marinho com alta restrição da pesca na costa brasileira (Gerhardinger *et al.* 2006).

Os dados da história de vida de *E. itajara* são quase inexistentes no Brasil. As informações quando disponíveis são fragmentadas e aparentemente insuficientes para avaliar o status da população de forma satisfatória na costa brasileira (Gerhardinger *et al.* 2006).

Justificativa

No mundo poucos dados foram gerados a partir de estudos sistemáticos com meros juvenis e poucos dos habitats de ocorrência foram investigados e avaliados para estudos de conservação da espécie. Os poucos dados obtidos podem ser associados à dificuldade de captura de meros juvenis em ambiente natural e também por serem raros em ambientes de manguezal com abundância histórica (Botero e Ospina 2003; Frias-Torres 2006).

No Brasil, os primeiros estudos para levantamento do status de conservação de *E. itajara* foi realizado por Ferreira e Maida (1995) sugerindo a classificação da espécie como ameaçada, alertando porém, a iminente reclassificação para categoria de espécie ameaçada sem o controle das ações de impacto nas populações ao longo da costa brasileira.

Segundo Ferreira *et al.* (2006), no Brasil, como na maior parte do mundo, os grandes meros se encontram sob ameaça, com populações decrescentes como resultado da pressão pesqueira e a degradação do habitat.

O litoral do Espírito Santo, especialmente a região norte apresenta indicativos importantes para estudos de conservação de *Epinephelus itajara* pela ocorrência frequente de áreas de manguezais com meros juvenis, pela prática de pesca de exemplares adultos e juvenis em diferentes épocas do ano e as perspectivas futuras de ampliação de portos e área estratégica para atividades petrolíferas no Brasil. Além disso, esta região enfrenta conflitos socioeconômicos, devido a proibição da pesca dos meros, e a necessidade de conservação da espécie. De forma similar, a costa brasileira apresentam os mesmos desafios para

conservação dos meros com variado grau de ameaça, porém com a necessidade de medidas urgentes para proteção dos habitats e controle da pesca ilegal.

Silva-Oliveira *et al.* (2008) reforçam a necessidade de estudos genéticos em mais áreas analisando marcadores nucleares para avaliar o fluxo genético e a dinâmica populacional que possam contribuir para o manejo e conservação dos meros na costa brasileira. Benevides (2011) reforça o status de ameaça da espécie relatando que apesar da grande variabilidade global, as análises locais revelam moderada a baixa variabilidade para as áreas de estudo.

Ferreira e Maida (1995) destacaram a escassez dos estudos sobre ciclos de vida ou abundância dos meros no Brasil, no entanto, quase duas décadas depois, poucos avanços científicos foram produzidos no Brasil para contribuir com o conhecimento e a conservação de *E. itajara* em quase todo seu limite de distribuição no Atlântico Tropical e Subtropical, com exceção dos trabalhos produzidos na região costeira e habitats de manguezal na Península da Flórida (EUA) que serviram de base para a maior parte do conhecimento atual sobre os meros no mundo.

OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento bioecológico dos meros (*Epinephelus itajara*), contribuindo para o direcionamento do manejo sustentável da pesca, acrescentando embasamento científico que possa direcionar o gerenciamento costeiro integrado para conservação da diversidade genética dos meros na sua área de distribuição, especialmente na costa brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ 1) Avaliar a relevância do valor ecológico dos habitats de manguezal para os meros juvenis no Atlântico oeste para sustentar a necessidade de medidas prioritárias de conservação deste habitat no planos de manejo costeiros, especialmente na costa brasileira;
- ⇒ 2) Analisar as características das unidades populacionais de meros juvenis (*Epinephelus itajara*), a partir de análise de marcadores mitocondriais Cyt *b* e D-Loop para definir os padrões de diversidade e fluxo genético na costa brasileira ;
- ⇒ 3) Aplicar a técnica do PCR-multiplex no desenvolvimento de primers específicos a partir do gene Citocromo c oxidase I (COI) para identificação dos meros e oito espécies de importância comercial da subfamília Epinephelinae como ferramenta para o monitoramento genético e fiscalização da pesca de meros;;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, O.; AGUILERA, D.R. 2004. Goliath Grouper (Pisces: Serranidae) from the Upper Miocene Urumaco Formation, Venezuela. *J. Paleont.*, 78(6): 1202–1206.
- BEGOSSI, A.; LOPES, P.F.M.; SILVANO, R. 2012b. Co-Management of Reef Fisheries of the Snapper-Grouper Complex in a Human Ecological Context in Brazil. In: G.H. Kruse, H.I. Browman, K.L. Cochrane, D. Evans, G.S. Jamieson, P.A. Livingston, D. Woodby and C.I. Zhang. (Org.). *Global Progress in Ecosystem-Based Fisheries Management*. 1ed. Fairbanks: Alaska Sea Grant, 2012 (1): 353-373.
- BENEVIDES, E.A. 2011. Diversidade Genética, Conectividade Populacional e Conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; PERCIFOMES: EPINEPHELIDAE) na Costa Atlântica da América do Sul. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal. 92p.
- BOTERO, J.; OSPINA, J.F. 2003. Crecimiento y Desempeño General de Juveniles Silvestres de Mero Guasa *Epinephelus itajara* (Lichtenstein) Mantenidos em Jaulas Flotantes Bajo Diferentes Condiciones de Cultivo. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 32: 25-36.
- BULLOCK, L.H.; M.D MURPHY; M.F. GODCHARLES & M.E. MITCHELL 1992. Age, growth, and reproduction of jewfish *Epinephelus itajara* in the eastern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.* 90: 243-249.
- CARLIN, J.L.; ROBERTSON, D.R.; BOWEN, B.W. 2003. Ancient divergences and recent connections in two tropical Atlantic reef fishes *Epinephelus adscensionis* and *Rypticus saponaceus* (Percoidae: Serranidae). *Marine Biology* 143: 1057–1069
- CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, G.R.; KOENIG, C.C.; ELEBY, B.M. 1999. Stock Identification of Gag, *Mycteroperca microlepis*, Along the Southeast Coast of the United States. *Mar. Biotechnol.* 1: 137–146.
- COATES, A.G.; JACKSON, J.B.C.; COLLINS, L.S.; CRONIN, T.M.; DOWSETT, H.T.; BYBELL, L.M.; JUNG, P.; OBANDO, J. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin* 104: 814–828.
- COLIN, P.L. 1990. Preliminary investigations of reproductive activity of the jewfish, *Epinephelus itajara*. In. Abstr. Gulf Caribb. Fish Inst., 43rd Annu. Sess., Miami, 4-9 Nov. 1990: 9-10.
- CRAIG, M.T.; GRAHAM, R.T.; TORRES, R.A.; HYDE, J.R.; FREITAS, M.O.; FERREIRA, B.P.; HOSTIM-SILVA, M.; GERHARDINGER, L.C.; BERTONCINI, 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 (ESR)* 7:167-174.
- CRAIG, M.T.; HASTINGS, P.A. 2007. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae with a revised classification of the tribe Epinephelini. *Ichthyological Research* 54: 1–17.
- CRAIG, M.T., SADOVY DE MITCHESON, Y. J.; HEEMSTRA, P.C. 2012. *Groupers of the World: A Field and Market Guide*, CRC Press. 424p.
- EKLUND, A.M. 2005. *Habitats Affinities of Juvenile Goliath Grouper to Assess Estuarine Conditions*. In: Bortone S.A. (ed) *Estuarine Indicators*. CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap.25 p. 393-407.
- EKLUND, A.M.; SCHULL, J. 2001. A stepwise approach to investigate the movement patterns and habitat utilization of goliath grouper, *Epinephelus itajara*, using conventional tagging, acoustic telemetry and satellite tracking. Pages 189–216 in J. R. Sibert and J. L. Nielsen, eds. *Electronic tagging and tracking in marine fisheries*. Springer-Verlag, New York.
- FERREIRA, B.P.; HOSTIM-SILVA, M.; GERHARDINGER, L.C.; ANDRADE, A.B. 2006. Investigación y conservación de Meros en Brasil: Grupo de Especialistas en Meros y Lábridos (GWSG) de la UICN. Boletín Especies Amenazadas América del Sur UICN.
- FERREIRA, B.P.; MAIDA, M. 1995. PROJETO MERO: apresentação e resultados preliminares. *Bol. Técn. Cient. CEPENE, Tamandaré* 3 (1): 204 - 213.

- FRIAS-TORRES, S. 2006. Habitat Use of Juvenile Goliath Grouper *Epinephelus itajara* in the Florida Keys, USA. *Endangered Species Research (ESR) 1*: 1-6.
- FRIAS-TORRES, S.; BARROSO, P.; EKLUND, A.M.; SCHULL, J.; SERAFY, J.E. 2007. Activity Patterns of Three Juvenile Goliath Grouper, *Epinephelus itajara*, in a Mangrove Nursery. *Bulletin of Marine Science 80(3)*: 587-594.
- GALINDO, H.; OLSON, D.; PALUMBI, S. 2006. Seascape genetics: A coupled oceanographic-genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Current Biology, 16*: 1622–1626. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.052
- GERHARDINGER, L.C.; MARENZI, R.C.; BERTONCINI, A.A.; MEDEIROS, R.P.; HOSTIM-SILVA, M. 2006. Local Ecological Knowledge on the Goliath Grouper *Epinephelus itajara* (Teleostei: Serranidae) in Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology 4(4)*:441-450.
- GOLD, J.R.; RICHARDSON, L.R. 1998. Mitochondrial DNA Diversification and Population Structure in Fishes From the Gulf of Mexico and Western Atlantic. *The Journal of Heredity 89(5)*: 404-414.
- HEEMSTRA, P.C.; RANDALL, J.E. 1993. Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome: Food and Agriculture Organization, 16(125): 382 p.
- HELLBERG, M.E.; BURTON, R.S.; NEIGEL, J.E.; PALUMBI, S.R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci .70*: 273–90.
- HOSTIM-SILVA, M.; ANDRADE, A.B.; GERHARDINGER, L.C.; MACHADO, L.F. 2005. The Lord of the Rocks conservation program in Brazil: the need for a new perception of marine fishes. *Coral Reefs 24*: 74.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 October 2013.
- KOENIG, C.C; COLEMAN, F.C.; EKLUND, A.M.; SCHULL, J.; UELAND, J. 2007. Mangroves as Essential Nursery Habitat for Goliath Grouper (*Epinephelus itajara*). *Bulletin of Marine Science 80(3)*: 567-586.
- LARA, M.R.; SCHULL, J.; JONES, D.L.; ALLMAN, R. 2009. Early life history stages of goliath grouper *Epinephelus itajara* (Pisces: Epinephelidae) from Ten Thousand Islands, Florida. *Endangered Species Research (ESR) 7*: 221-228.
- MAGGIO, T; ANDALORO, F.; ARCULEO, M. 2005. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 321*: 83– 92.
- MAGGIO, T; ANDALORO, F.; ARCULEO, M. 2006, Genetic population structure of *Epinephelus marginatus* (Pisces, Serranidae) revealed by two molecular markers. *Italian Journal of Zoology 73(3)*: 275–283.
- MORRIS, A.V.; ROBERTS, C.M.; HAWKINS, J.P. 2000. The threatened status of groupers (Epinephelinae). *Biodiversity and Conservation 9*: 919–942.
- PALUMBI, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst. 25*: 547–572.
- PINA-AMARGÓS, F.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G. 2009. Movement patterns of goliath grouper *Epinephelus itajara* around southeast Cuba: implications for conservation. *Endangered Species Research (ESR) 7*: 243–247. DOI: 10.3354/esr00192
- PORTNOY, D.S; HOLLENBECK, C.M.; RENSCHAW, M. A.; CUMMINGS, N.J.; GOLD, J.R.. 2013. Does mating behaviour affect connectivity in marine fishes? Comparative population genetics of two protogynous groupers (Family Serranidae). *Molecular Ecology 22*: 301–313. DOI: 10.1111/mec.12128
- RAMÍREZ, M.A.; PATRICIA-ACEVEDO, J.; PLANAS, S.; CARLIN, J.L.; FUNK, S.M. & MCMILLAN, W.O. 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae) *Molecular Ecology Notes 6*: 813–817.
- RICHARDSON, L.R.; GOLD, J.R. 1997. Mitochondrial DNA diversity in and population structure of red grouper *Epinephelus morio*, from the Gulf of México. *Fishery Bulletin 951*: 174-179.
- SADOVY, Y.; EKLUND, A.M. 1999. Synopsis of biological information on the Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, (Bloch 1792), and the jewfish, *E. itajara* (Lichtenstein 1822). NOAA Technical Report, NMFS 146, and FAO Fisheries Synopsis 157. 65 p.

- SILVA-OLIVEIRA, G.C.; RÊGO, P.S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. & VALLINOTO, M. 2008. Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper (*Epinephelus itajara*, Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 988-994.
- SMITH, C. L. 1971. A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 146: 67–241.
- STEVENSON, D.E; CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, B.R. 1998. Stock Identification in Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, Using Microsatellites DNA Analysis. *Proceedings of the 50th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*: 729-747.
- TORRES, R.A.; FEITOSA, R.B.; CARVALHO, D.C.; FREITAS, M.O.; HOSTIM-SILVA, M.; FERREIRA, B.P. 2013. DNA barcoding approaches for fishing authentication of exploited grouper species including the endangered and legally protected goliath grouper *Epinephelus itajara*. *Scientia Marina* 77(3): 409-418. DOI: 10.3989/scimar.03805.29A
- WARD, R.; FIGUEROLA, M.; LUCKHURST, B.E.; BLANDON, I.V. & KAREL, W.J. 2002. Genetic Characterization of Red Hind, *Epinephelus guttatus* Collected from Three Spawning Aggregations in Western Puerto Rican Waters – Variation in Allozymes, *Gulf an Caribbean Fisheries Institute* 53: 460-471.
- WEERSING, K.; TOONEN, R.J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 393: 1–12. DOI: 10.3354/meps08287
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O.; CHAPMAN, R.W. 2002.Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci*(Teleostei: Serranidae). *Molecular Ecology Notes* 2: 217–219.
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O.; SEDBERRY, G.R. 2004.Population genetic analysis of red grouper, *Epinephelus morio*, and scamp, *Mycteroperca phenax*, from the southeastern U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 144:769–777.

Capítulo 1: Uso do Habitat de Manguezal por Meros Juvenis (*Epinephelus itajara*)

Damasceno, J.S.¹; Machado, L.F.²; and Hostim-Silva, M.²

¹ Departamento de Oceanografia e Ecologia, Base Oceanográfica, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz, ES, Brazil*

² Departamento de Ciências da Saúde, Agrárias e Biológicas, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil

*Corresponding author: Júnio Damasceno de Souza (jdamascenobh@gmail.com)

RESUMO

Os ecossistemas costeiros têm sido intensamente modificados pelas atividades humanas e degradados pela ocupação e poluição. Dentre estes ambientes, os habitats de manguezal sofrem acelerado processo de degradação e equivocadamente pouco valorizado quanto às contribuições biológicas, sociais e econômicas. Os peixes da subfamília Epinephelinae são estreitamente relacionados aos ambientes costeiros marinhos, especialmente habitats recifais e os meros (*Epinephelus itajara*) com populações reduzidas pela pesca excessiva têm sido seriamente ameaçados pela perda dos habitats de reprodução (recifes) e crescimento (manguezal). O presente estudo enfatiza a importância dos manguezais para os meros juvenis e analisa os primeiros dados de caracterização biológica dos meros juvenis em um estuário em ambiente tropical. O presente estudo identificou alta frequência (90%) de exemplares de meros juvenis entre 100 e 300 mm, o que não ocorreu nos principais estudos pesquisados com juvenis da espécie. As capturas foram realizadas ao longo de todos os meses do ano, com frequência significativamente maior no período que compreende a estação quente e chuvosa no Brasil tropical e com tamanhos significativamente maiores no período de transição entre o fim do verão e início do inverno (estação fria e seca). Estudos comparativos de meros juvenis em outros ambientes subtropicais sugerem que os manguezais podem ser habitats berçário e indiscutivelmente como habitats fundamentais para os primeiros estágios de vida da espécie. A alta abundância de meros juvenis, com média inferior a outros estuários, pode ser um indicativo de habitat com baixa qualidade de sobrevivência ou alta influência da pesca predatória. Apesar da necessária prudência na manutenção da proibição da pesca dos meros na costa brasileira, a medida à longo prazo se tornará ineficaz sem que os habitats de manguezal e a conectividade com habitats recifais dos ciclos de vida das espécies ameaçadas, não sejam recuperados e protegidos integralmente.

Palavras chaves: Espécie ameaçada, ecologia, manguezais, ciclo de vida, Epinephelinae, Conservação

INTRODUÇÃO

Os habitats costeiros fornecem funções ecológicas indispensáveis para as espécies marinhas, que, no entanto, estão sendo ameaçados com a perda da diversidade ecológica em razão da pesca excessiva e acelerado processo de interferência das atividades humanas (Jackson 2001; Seitz *et al.* 2013), provocando alterações na composição das espécies e na complexidade estrutural das cadeias tróficas, o que causam efeitos negativos e difíceis de serem revertidos (Hughes *et al.* 2005; Waycott *et al.* 2009; Seitz *et al.* 2013).

Os manguezais, recifes de coral, estuários, pântanos salinos e seagrass (angiospermas marinhas submersas) são ecossistemas marinhos costeiros que dispõem de habitats relevantes para a biodiversidade, pois servem de refúgio e berçários para muitos organismos marinhos, incluindo espécies de importância comercial e também espécies ameaçadas (Lacerda 1993; Gray 1997). Os ecossistemas de manguezais

desempenham papel essencial na sustentabilidade das atividades de pesca e na regulação da hidrodinâmica estuarina, no entanto, sua importância ecológica, social e econômica tem sido historicamente subestimada. Por outro lado, a intensificação da pesca tem causado a eliminação gradual e global de espécies de grande porte e de alta longevidade nos ecossistemas marinhos, substituindo-as por espécies menores, de ciclos de vida curtos, organizados em cadeias tróficas simplificadas (Pauly *et al.* 2002).

Grupo ameaçado pela pressão pesqueira, as espécies da subfamília Epinephelinae, dentre elas os meros [*Epinephelus itajara* (Lichtenstein 1822)], são peixes que de uma forma geral assumem grande importância para pesca em todo o mundo. O grande porte e característica trófica de predadores de topo, como o mero, são fundamentais na moderação e regulação da abundância das suas presas (Hixon e Carr 1997; Stewart e Jones 2001). No entanto, deve-se ressaltar que esta espécie está associada principalmente às áreas de manguezais com alta complexidade espacial que são ambientes ameaçados pelo processo de degradação e destruição por toda sua extensão nas regiões tropicais e subtropicais (Faunce e Serafy 2006; Frias-Torres, 2006; Koenig *et al.* 2007).

Características biológicas, ecológicas e comportamentais de muitos Epinephelinae os tornam particularmente vulneráveis à pesca excessiva e a destruição de seus habitats. Com isso, conhecer a importância ecológica dos habitats de manguezais torna-se fundamental no direcionamento das medidas de conservação especificamente dos meros, espécie criticamente ameaçada de extinção (IUCN 2013).

O presente trabalho tem o objetivo de buscar elementos elucidativos da importância ecológica do manguezal para *E. itajara* juvenis. Para tal, foram comparadas as informações disponíveis sobre os habitats utilizados por meros e por outros Epinephelinae no Atlântico oeste e analisados dados sobre a abundância relativa dessa espécie em habitats de manguezal. Além disso, a partir dos dados coletados, este estudo avalia o papel ecológico deste ambiente para a sinergia entre conservação do ambiente, seu valor ecológico e a relevância desta interação para as características biológicas dos meros juvenis (*E. itajara*) no Atlântico oeste.

Dentro desta perspectiva foram abordados três tópicos de discussão: 1) Análise da importância dos habitats para as espécies da subfamília Epinephelinae com distribuição costeira no Atlântico Tropical e Subtropical oeste através de um levantamento bibliográfico, identificando habitats relevantes para as espécies da subfamília; 2) Levantamento comparativo em relação aos meros (*E. itajara*) na literatura, visando identificar o tipo de habitat nas distintas localidades e 3) Acrescentar a essa literatura, novos dados biológicos a respeito dos meros juvenis, obtidos em pesquisa feita no estuário da unidade de conservação da Área de Proteção Ambiental de Conceição da Barra (Espírito Santo) que compõe a costa tropical leste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa Bibliográfica da Subfamília Epinephelinae na Costa Oeste do Atlântico

Pesquisa bibliográfica inicial foi realizada para quantificar a frequência de ocorrência das espécies da subfamília Epinephelinae em 27 estudos de levantamento da ictiofauna em ambientes costeiros e estuarinos no Atlântico Oeste.

Com base no registro das espécies nos 27 levantamentos foi realizada nova pesquisa bibliográfica em 50 estudos com o objetivo de obter as informações para caracterização dos habitats costeiros de cada uma das espécies da subfamília Epinephelinae. Nestes 50 trabalhos foram reunidos dados sobre distribuição, limites de profundidade, comprimento máximo, pressão pesqueira e todos os habitats costeiros ocupados por adultos e juvenis de cada espécie da subfamília com distribuição no Atlântico Oeste. Os limites de distribuição de cada espécie foram analisados seguindo divisão em províncias biogeográficas proposta por Spalding *et al.* (2007) (Figura 1).

Pesquisa de *Epinephelus itajara* Juvenis na APA de Conceição da Barra

Área de Estudo

Os dados primários sobre uso do habitat por meros foram amostrados na área estuarina do manguezal da unidade de conservação pertencente à Área de Proteção Ambiental (APA) de Conceição da Barra (ACB), do Rio São Mateus, no município de Conceição da Barra, litoral norte do Espírito Santo (18°36' S e 39°44' O). Os manguezais do Espírito Santo são principalmente representados por quatro espécies de mangues (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans*), ocupando uma área aproximada de 70 km² e caracterizada por planícies costeiras estreitas, lagoas costeiras localizadas atrás de restingas, pluviosidade anual em torno de 1.200mm e marés com amplitude entre 0,7 e 1,3m. As florestas de mangue bem desenvolvidas podem atingir até 15m de altura (Schaeffer-Novelli *et al.* 1990). As florestas mais extensas são encontradas no entorno da baía de Vitória e nos estuários dos rios Piraquê-açu e São Mateus (Silva *et al.* 2005).

A ictiofauna demersal dos estuários na costa norte do Espírito Santo apresenta baixa diversidade de espécies comparada a outros sistemas estuarinos na costa brasileira. Suas espécies mais representativas são da família Sciaenidae, Carangidae e Gerreidae (Hostim-Silva *et al.* 2013).

Método de Coleta

Os dados referentes aos padrões de variação ao longo do tempo dos meros juvenis na área de estudo da APA de Conceição da Barra (ACB) foram obtidos entre novembro de 2011 a outubro de 2013 utilizando-se 22 armadilhas (covos) de dois formatos (retangular e cilíndrico) baseados em modelo de armadilhas tradicionais utilizadas na captura de siris (*Callinectes*): de formato retangular confeccionados com 50 cm de comprimento, 50 cm de largura e 25 cm de altura. As armadilhas apresentavam duas entradas em forma de

funil com 20 cm na parte externa e 12 cm na parte interna. Aquelas de formato cilíndrico foram confeccionadas com 40 cm de diâmetro e 100 cm de comprimento. A entrada externa foi confeccionada em forma de funil com 40 cm e a parte mais interna com 15 cm, dando acesso para uma câmara, onde outro funil com as mesmas dimensões dá acesso para uma segunda câmara. As armadilhas foram envolvidas em tela plástica de PVC com espaçamento de 1 cm. Seis armadilhas retangulares de captura de peixes (100 cm x 200 cm x 40 cm), com as mesmas características, foram utilizadas visando a captura de juvenis maiores. As armadilhas foram distribuídas ao longo dos canais de manguezal com espaçamento aproximado de 100 metros entre elas. As armadilhas foram mantidas em tempo integral no manguezal, sendo iscadas três vezes por semana.

Capturas efetuadas por outros métodos de pesca (linha e anzol, peneira, puçá, rede de arrasto por barco a motor, rede de espera e tarrafa) e doação ocasional de exemplares contribuíram, em menor escala (<4%), para a obtenção de indivíduos da espécie, que são objetos deste estudo.

Todos os indivíduos capturados foram marcados por tags numerados (T-Bar anchor) (FloyTag®), medidos, pesados e liberados no local de coleta. A captura e marcação dos meros (*E. itajara*) no litoral do Espírito Santo foi realizada a partir da obtenção da licença emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO/ICMBIO/MMA (Nº: 25088-7 – Código de autenticação: 11.928.433).

Análise de Dados

O número de meros juvenis capturados por armadilha em cada mês e os dados de comprimento total (CT) foram avaliados para identificar provável variação sazonal na frequência de captura e no tamanho dos exemplares. Os dados de abundância foram analisados pela CPUE (captura mensal de meros juvenis por armadilha). Foram realizados diferentes agrupamentos para identificar o período do ano que apresentou diferença significativa. O comprimento total (CT) dos meros juvenis foi analisado em quatro períodos do ano (1. janeiro a março; 2. abril a junho; 3. julho a setembro; 4. outubro a dezembro), visando identificar diferença significativa nos tamanhos dos indivíduos capturados nas armadilhas. Os dados foram comparados utilizando o teste de variância (Kruskal-Wallis) e o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum).

Os dados do presente estudo foram comparados com outros 11 trabalhos específicos sobre *Epinephelus itajara* juvenil (Bullock *et al.* 1992; Eklund e Schull 2001; Bostero e Ospina 2003; Eklund 2005; Frias-Torres 2006; Koenig *et al.* 2007; Cass-Calay e Schmidt 2008; Frias-Torres e Luo 2008; Brusher e Schull 2009; Giglio e Freitas 2013; Lara *et al.* 2009) realizados em outras áreas no limite de distribuição da espécie.

RESULTADOS

Pesquisa Bibliográfica

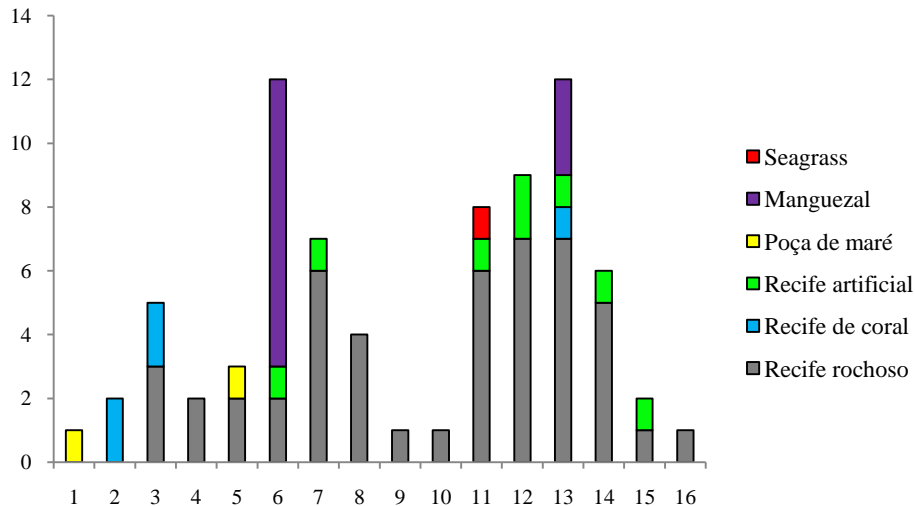
Estudos de Levantamento da Ictiofauna em Ambientes Costeiros

Estudos de levantamento da ictiofauna em ambientes costeiros do Atlântico Tropical e Subtropical Oeste revelaram que das 25 espécies da subfamília Epinephelinae, as espécies registradas com maior frequência foram *Epinephelus itajara* (44%) e *Mycteroperca bonaci* (41%), perfazendo um total de 16 espécies (64%) (Figura 1).

Dos 27 levantamentos da ictiofauna, 11 (41%) foram realizados em habitat de manguezal (Barletta *et al.* 1998; Castro 2001; Barletta *et al.* 2003; Paiva *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2008; Barletta e Costa 2009; Basílio *et al.* 2009; Osório *et al.* 2011; Giglio e Freitas 2013; Hostim-Silva *et al.* 2013; Vilar *et al.* 2013); 10 (37%) foram realizados em habitats de recifes rochosos (Ferreira *et al.* 2001; Luiz Jr *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2008; Hackradt e Felix-Hackradt 2009; Honorio e Ramos 2010; Rocha *et al.* 2010; Alves e Pinheiro 2011; Hackradt *et al.* 2011; Simon *et al.* 2011; Daros *et al.* 2012;); três (11%) foram realizados em habitats de recifes de corais (Rooker *et al.* 1997; Aguilar-Pereira e Appeldoorn 2008; Chaves *et al.* 2010); dois (7%) em habitats de recifes artificiais (Hackradt *et al.* 2011; Simon *et al.* 2011); um (4%) em habitats de poça de maré (Cunha *et al.* 2007); um estudo (4%) em habitat de seagrass (Vilar *et al.* 2011).

Os meros (*E. itajara*) em três estudos foram observados em habitat de recifes rochosos (Luiz Jr. *et al.* 2008; Hackradt e Felix-Hackradt 2009 e Hackradt *et al.* 2011); em nove estudos em habitats de manguezais (Barletta *et al.* 1998; Castro 2001; Barletta *et al.* 2003; Paiva *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2008; Barletta e Costa 2009; Giglio e Freitas 2013; Hostim-Silva *et al.* 2013; Vilar *et al.* 2013).

Os habitats de recifes rochosos foram os mais representativos em diversidade de espécies (87.5%), no entanto deve ser ressaltado que houve apenas 10 citações neste habitat (37%). Nos habitats de manguezal, por outro lado, foram registradas apenas duas espécies da subfamília Epinephelinae: *Epinephelus itajara* e *Mycteroperca bonaci*. Em 11 estudos analisados, *E. itajara* foi citada nove vezes (82%), enquanto *M. bonaci* foi citada apenas três vezes (27%) e as duas espécies juntas foram citadas em apenas um estudo realizado no habitat de manguezal (Figura 1).



1. *Alphestes afer* 2. *Cephalopholis cruentata* 3. *Cephalopholis fulva* 4. *Cephalopholis furcifer* 5. *Epinephelus adscensionis* 6. *Epinephelus itajara* 7. *Epinephelus marginatus* 8. *Epinephelus morio* 9. *Hyporthodus flavolimbatus* 10. *Hyporthodus nigritus* 11. *Hyporthodus niveatus* 12. *Mycteroperca acutirostris* 13. *Mycteroperca bonaci* 14. *Mycteroperca interstitialis* 15. *Mycteroperca microlepis* 16. *Mycteroperca venenosa*

Figura 1. Número de citações das espécies da subfamília Epinephelinae em diferentes habitats costeiros.

Pesquisa Bibliográfica

A subfamília Epinephelinae na costa Oeste do Atlântico

A subfamília Epinephelinae está amplamente distribuída na costa Oeste do Atlântico, principalmente na província do Atlântico Tropical Noroeste. Das 25 espécies de Epinephelinae, 72% ocorrem na província do Atlântico Tropical Noroeste, 68% no Atlântico Temperado Noroeste, 72% no Atlântico Tropical Sudoeste e 48% no Atlântico Temperado Sudoeste. Dessas espécies, apenas *Epinephelus marginatus* apresenta limites mais amplos em outras áreas geográficas, sendo que no Atlântico Oeste sua presença é mais freqüente no Atlântico Temperado Sudoeste. A província biogeográfica da Plataforma Norte do Brasil está representada por seis espécies (24%): *Epinephelus itajara*, *Mycteroperca interstitialis*, *M. microlepis*, *M. phenax*, *M. tigris* e *Paranthias furcifer*, do gênero *Epinephelus*, na foz da bacia do Rio Amazonas, apenas *E. itajara* foi registrada (Figura 2).

A amplitude nos limites de profundidade das 25 espécies Epinephelinae do Atlântico Oeste é bem variável. Dessas, sete espécies (28%) ocorrem até 50 metros de profundidade; 14 espécies (56%) ocorrem acima de 100 metros; 19 espécies (76%) ocorrem acima de 200 metros e seis espécies (24%) ocorrem em limites de profundidade abaixo de 250 metros. Os nichos de maiores profundidades foram os mais comuns para *Gonioplectrus hispanus* e as espécies do gênero *Hyporthodus* (*H. flavolimbatus*, *H. mystacinus*, *H. nigritus* e *H. niveatus*) (Tabela I).

A maioria das espécies de Epinephelinae (64%) do Atlântico Oeste atinge de 50 a 150 cm de CT. Apenas cinco espécies (20%) são menores de 50 cm e apenas duas espécies (*E. itajara* e *H. nigritus*) ultrapassam o limite de 200 cm no CT.

Quanto ao impacto da pesca sobre a Subfamília, das 25 espécies presentes no Atlântico Oeste, 16 (64%) sofrem alta pressão pesqueira em seus limites de distribuição sendo que dessas, cinco (20%) ainda com populações estáveis, 10 (36%) apresentam indícios de declínio dos seus estoques e apenas *E. itajara* (4%) teve alta pressão pesqueira histórica e não tem alta pressão atual pelas populações reduzidas.

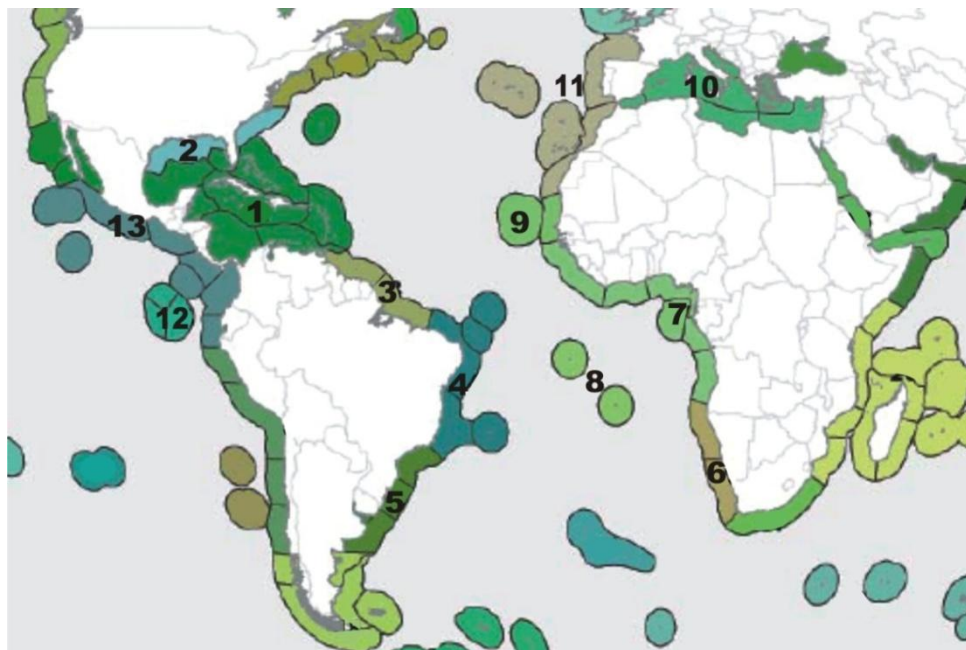


Figura 2. Províncias biogeográficas de distribuição das espécies da subfamília Epinephelinae no Atlântico. 1. Atlântico Tropical Noroeste 2. Atlântico Temperado Noroeste 3. Plataforma Norte do Brasil 4. Atlântico Tropical Sudoeste 5. Atlântico Temperado Sudoeste 6. Benguela 7. Golfo da Guiné 8. Ilhas Santa Helena e Ascensão 9. Transição da África Oeste 10. Mar Mediterrâneo 11. Lusitaniana 12. Galápagos 13. Pacífico Tropical Leste. Cores idênticas indicam domínios de endemismos costeiros com características biológicas, físicas, geográficas e evolutivas similares (Adaptado: Spalding *et al.* 2007).

Quanto ao uso dos habitats costeiros, fica evidente a importância dos recifes coralíneos e rochosos para as espécies Epinephelinae no Atlântico Oeste. Todas as espécies utilizam os recifes como habitat na maior parte da vida ou como um habitat de mudança ontogenética na fase juvenil, ou utilizam os recifes como a principal área reprodutiva. Provavelmente, muitas das espécies, sem dados conclusivos sobre habitat reprodutivo, devam utilizar os recifes com a finalidade de reprodução.

A importância dos recifes como habitat costeiro para juvenis Epinephelinae é ainda pouco conhecida. Enquanto os recifes de corais são habitats de 18 espécies (72%) na fase adulta, apenas é conhecido como habitat para 10 espécies (40%) na fase juvenil. No caso de recifes rochosos, essa diferença é ainda mais marcante, com 23 espécies (92%) utilizando esse habitat na fase adulta e apenas quatro (16%) na fase juvenil. Já os recifes artificiais foram registrados em oito espécies (32%) na fase adulta com maior frequência de uso para Epinephelinae juvenis do que os recifes rochosos; sete espécies (28%) (Tabela I).

Os habitats de “seagrass” e manguezais foram relevantes como habitat para os juvenis e apenas eventualmente para os adultos. Das 12 espécies (48%) da subfamília Epinephelinae do Atlântico Oeste citadas que utilizam estes habitats, oito (32%) foram registradas apenas para exemplares juvenis e quatro apenas para exemplares adultos (*Alphistes afer*, *Cephalopholis cruentata*, *C. fulva* e *Epinephelus guttatus*).

Estas três primeiras espécies no “seagrass”, no entanto, apresentam tamanho reduzido (32 cm a 42 cm) quando comparado com outras espécies e a última é um dos menores do gênero (76 cm), sugerindo a importância desse habitat para exemplares pequenos das espécies dessa subfamília. O habitat de manguezal foi registrado apenas para juvenis de cinco espécies (*Epinephelus itajara*, *Mycteroperca acutirostris*, *M. intertialis*, *M. microlepis* e *M. phenax*) que são os principais habitats naturais para juvenis de *E. itajara* e *M. phenax* (Tabela I).

Estudos de *Epinephelus itajara* Juvenis na APA de Conceição da Barra

Os raros estudos de meros juvenis realizados em áreas tropicais revelam ainda pouco conhecimento biológico sobre *E. itajara*. A pesquisa de uso e conservação do habitat no Espírito Santo (Brasil) que compõe este trabalho é um dos primeiros trabalhos em ambiente natural com meros juvenis na costa brasileira e em ambiente tropical (Tabela II).

Os dados de tamanho médio dos meros (*E. itajara*) juvenis, que analisados pelo comprimento total, no Espírito Santo (Brasil), são um dos menores (192 mm) registrados, comparando-se com outros estudos realizados (> 300 mm), com juvenis na sua área de distribuição. Apenas os dados registrados por Lara *et al.* (2009) e este estudo apresentam uma média de comprimento total inferior a 200 mm (Tabela II).

Tabela I. Espécies da subfamília Epinephelinae com distribuição no Atlântico Tropical e Subtropical Oeste com dados comparativos dos limites de ocorrência, profundidade, comprimento máximo, grau de impacto da pesca e os habitats costeiros ocupados por cada uma das 25 espécies registradas em extenso levantamento bibliográfico. (Distribuição predominante: 1. Atlântico Tropical Noroeste 2. Atlântico Temperado Noroeste 3. Plataforma Norte do Brasil 4. Atlântico Tropical Sudoeste 5. Atlântico Temperado Sudoeste 6. Benguela 7. Golfo da Guiné 8. Ilhas Santa Helena e Ascensão 9. Transição da África Oeste 10. Mar Mediterrâneo 11. Lusitânica 12. Galápagos 13. Pacífico Tropical Leste. / Pressão pesqueira: 1. Baixo; 2. Significativa regional; 3. Significativa; 4. Alto estável; 5. Alto em declínio; 6. Alto histórica. / Habitats Costeiros: A. adulto; J. juvenil; R. reprodução).

ESPÉCIES	Distribuição predominante	Limites de Profundidade (m)	Comp. Max. (cm)	Grau de pesca	HABITATS COSTEIROS							Referências	
					Fundo arenoso / argiloso	Macroalgas e Seagrass	Manguezais	Poças de maré	Recifes artificiais	Recifes de corais	Recifes e fundos rochosos		
<i>Alphestes afer</i> (Bloch 1793)	1.4.7	1-30	33	1		A.J			A	J	A.R	A.R	5.10.11.21.30.32
<i>Cephalopholis cruentata</i> (Lacepède, 1802)	1.2	1-200	32	2		A			A		A.J	A	10.20.46
<i>Cephalopholis fulva</i> (Linnaeus, 1758)	1.2.4.5	1-45	42	4		A					A.J	A.J	4.10.21.39.45
<i>Dermatolepis inermis</i> (Valenciennes, 1833)	1.2.4	20-210	91	1							A	A	10.21
<i>Epinephelus adscensionis</i> (Osbeck, 1765)	1.2.4.5.7.8.11	2-100	60	2					A	A		A	10.11.21.40
<i>Epinephelus drummondhayi</i> Goode & Bean, 1879	2	10-180	110	4	A						A	A	10.14.21
<i>Epinephelus guttatus</i> (Linnaeus, 1758)	1.2	2-100	76	4	J	A					A.R	A.J.R	6.10.21.27.35.43.44
<i>Epinephelus itajara</i> (Lichtenstein, 1822)	1-5.7.9	1-100	250	1.6	A		J			A.J.R	A	A	10.13.19.21.25.31.38.42.43
<i>Epinephelus marginatus</i> (Lowe, 1834)	5-11	1-50	143	5.6	A				A.J	A.J		A	6.9.10.12.15.18.19.20.21.28.29.34
<i>Epinephelus morio</i> (Valenciennes 1828)	1.2.4	5-300	120	5.6	A.J.R	J					J.R	A.J	3.6.7.10.21.24
<i>Epinephelus striatus</i> (Bloch, 1792)	1.4	1-90	120	5.6			J			A.J	A.J.R	A.R	1.2.5.8.10.11.21.26.35.45.48
<i>Gonioplectrus hispanus</i> (Cuvier, 1828)	1.2.4	60-365	30	1	A						A	A	10.21
<i>Hyporthodus flavolimatus</i> Poey, 1865	1.2.4.5	90-360	115	5	A							A	10.21.22
<i>Hyporthodus mystacinus</i> (Poey, 1852)	1.2.4.12.13	100-400	160	1.2							J	A	10.21
<i>Hyporthodus nigrurus</i> (Holbrook, 1855)	1.2.4	55-525	230	5	A					J	A.J	A	6.10.12.21.33
<i>Hyporthodus niveatus</i> (Valenciennes, 1828)	1.2.4.5	30-525	120	5	A	J				A	A.J	A.J	6.10.19.21.28.37.45.47.49
<i>Mycteroperca acutirostris</i> (Valenciennes, 1828)	1.4.5.	2-100	80	4	A	J	J	J	A	J	J	A	6.10.12.15.16.19.21.28
<i>Mycteroperca bonaci</i> (Poey, 1860)	1.2.4.5.7	10-30	152	5.6		J					A	A	6.10.21
<i>Mycteroperca cidi</i> Cervigón, 1966	4	5-40	114	3	J	J					A.J		10.21

Continuação...

Tabela I. Espécies da subfamília Epinephelinae com distribuição no Atlântico Tropical e Subtropical Oeste com dados comparativos dos limites de ocorrência, profundidade, comprimento máximo, grau de impacto da pesca e os habitats costeiros ocupados por cada uma das 25 espécies registradas em extenso levantamento bibliográfico. (Distribuição predominante: 1. Atlântico Tropical Noroeste 2. Atlântico Temperado Noroeste 3. Plataforma Norte do Brasil 4. Atlântico Tropical Sudoeste 5. Atlântico Temperado Sudoeste 6. Benguela 7. Golfo da Guiné 8. Ilhas Santa Helena e Ascensão 9. Transição da África Oeste 10. Mar Mediterrâneo 11. Lusitaniana 12. Galápagos 13. Pacífico Tropical Leste. / Pressão pesqueira: 1. Baixo; 2. Significativa regional; 3. Significativa; 4. Alto estável; 5. Alto em declínio; 6. Alto histórica. / Habitats Costeiros: A. adulto; J. juvenil; R. reprodução).

ESPÉCIES	Distribuição predominante	Limites de Profundidade (m)	Comp. Max. (cm)	Grau de pesca	HABITATS COSTEIROS						Referências	
					Fundo arenoso / argiloso	Macroalgas e Seagrass	Manguezais	Poças de maré	Recifes artificiais	Recifes de corais		Recifes e fundos rochosos
<i>Mycteroperca interstitialis</i> (Poey, 1860)	2.3.5.8	20-150	84	1.5	A		J			A.J.R	A	6.10.15.21.28.36
<i>Mycteroperca microlepis</i> (Goode & Bean, 1880)	1-3.8	40-100	145	5		J	J		A.J	A.R	A	10.19.21.23.24.41.50
<i>Mycteroperca phenax</i> Jordan & Swain, 1885	1-4	30-100	107	4			J		J	A.R		10.21.24
<i>Mycteroperca tigris</i> (Valenciennes, 1833)	3-5.7	10-40	100	2						A.R	A	8.10.21.36
<i>Mycteroperca venenosa</i> (Linnaeus, 1758)	4.5.7	2-137	100	5.6		J				A.R	A	10.21.36
<i>Paranthias furcifer</i> (Valenciennes, 1828)	2.3.5.7	1-30	35	1					A		A	10.21.40

Referências:

1. Aguilar-Pereira & Aguilar-Dávila (1996) 2. Aguilar-Pereira *et al.* (2006) 3. Albañez-Lucero & Aguerri-Sánchez (2009) 4. Aratijo & Martins (2009) 5. Beets & Hixon (1994) 6. Begossi *et al.* (2012a) 7. Coleman *et al.* (2010) 8. Colin *et al.* (2003) 9. Conini *et al.* (2007) 10. Craig *et al.* (2011) 11. Cunha *et al.* (2007) 12. Daros *et al.* (2012) 13. Eggleston (1995) 14. Farmer & Karnaukas (2013) 15. Ferreira *et al.* (2001) 16. Floeter *et al.* (2006) 17. Frias-Torres (2006) 18. Gibran (2007) 19. Hackradt *et al.* (2011) 20. Harmelin & Harmelin-Vivien (1999) 21. Heemstra & Randall (1993) 22. Jones *et al.* (1989) 23. Koenig & Colin (1999) 24. Koenig *et al.* (2000) 25. Koenig *et al.* (2007) 26. Legare *et al.* (2011) 27. López-Rivera & Sabat (2009) 28. Luiz Jr. *et al.* (2008) 29. Machado *et al.* (2003) 30. Marques e Ferreira (2011) 31. McClenachan (2009) 32. Medeiros *et al.* (2009) 33. Mejía-Landino *et al.* (2003) 34. La Mesa *et al.* (2002) 35. Munro & Blok (2005) 36. Nemeth *et al.* (2006) 37. Oliveira *et al.* (2007) 38. Phelan (2008) 39. Reynal *et al.* (2004) 40. Rooker *et al.* (1997) 41. Ross & Moser (1995) 42. Sadovy & Eklund (1999) 43. Sadovy (2000) 44. Sadovy *et al.* (1994) 45. Sazima *et al.* (2005) 46. Sluka *et al.* (2001) 47. Vilar *et al.* (2011) 48. Waylen *et al.* (2004) 49. Ximenes-Carvalho (1999) 50. Koenig & Coleman 1998

Os estudos comparativos de meros juvenis sobre temas e localidades distintos foram desenvolvidos apenas em habitat de manguezal. Não foram encontrados na literatura citações com estudos sistemáticos de *E. itajara* em habitat diferente de manguezal.

Dados comparativos da CPUE (captura / armadilha / ano) e comprimento total médio (CT médio) de *E. itajara*, nos habitats de manguezal do Espírito Santo (Brasil) (Este estudo) e nos rios e canais da Flórida (EUA) (Eklund 2005), revelam alta captura (ES: 3,1 mero / armadilha / ano e Flórida: 0,2 a 2,1 mero / armadilha / ano). No entanto, para estas mesmas áreas ocorre baixa média de comprimento total (ES: 192 mm e Flórida: ± 220 a 400 mm).

Tabela II. Estudos realizados sobre meros juvenis (*Epinephelus itajara*) abordando temas distintos na região da Flórida, Golfo do México, Caribe e no Brasil. Os dados apresentados fazem um comparativo do número de amostras coletadas e o comprimento total (CT) máximo, mínimo e a média (Φ).

Tema do Estudo	Local	Habitat	N	Comprimento Total (mm)	Citação
Idade e Crescimento	Golfo do México (EUA)	Manguezal	76	328 – 1218 (Φ ?)	Bullock <i>et al.</i> 1992
Padrão de Movimentação	Flórida (EUA)	Manguezal	148	205 – 1005 (Φ 684)	Eklund e Schull 2001
Crescimento e Cultivo	Caribe (Colômbia)	Manguezal	133	(Φ 302)	Botero e Ospina 2003
Caracterização de Habitat	Flórida (EUA)	Manguezal	687	103 – 903 (Φ >300)	Eklund 2005
Caracterização de Habitat	Flórida (EUA)	Manguezal	52	120 – 1100 (Φ 420)	Frias-Torres 2006
Caracterização de Habitat	Flórida (EUA)	Manguezal	1116	101 – 1000 (Φ 630)	Koenig <i>et al.</i> 2007
Índice de Abundância	Flórida (EUA)	Manguezal	419	>200 – 1000 (Φ 583)	Cass-Calay e Schmidt 2008
Comportamento	Flórida (EUA)	Manguezal	18	330-900 (Φ 564)	Frias-Torres e Luo 2008
Idade e Crescimento	Flórida (EUA)	Manguezal	1144	145 – 1005 (Φ 419)	Brusher e Schull 2009
Idade e Crescimento	Flórida (EUA)	Manguezal	45	16 – 87 (Φ ?)	Lara <i>et al.</i> 2009
Caracterização da Pesca	Bahia (Brasil)	Manguezal	8	261 – 645 (Φ 394)	Giglio e Freitas 2013
Uso do Habitat	Espírito Santo (Brasil)	Manguezal	176	59-457 (Φ 192)	Este estudo 2014

Ecologia de Meros Juvenis em um Habitat de Manguezal

Foram medidos e pesados 176 meros juvenis, entre novembro de 2011 a outubro de 2013 e destes marcados 130, com 21 recapturas. As capturas utilizando-se armadilhas totalizaram 162 meros juvenis, com exemplares medindo entre 59 e 457 mm (média = 192 mm) de comprimento total (CT) e entre 49 e 358 mm (média = 154 mm) de comprimento padrão, pesando entre 3 e 1530 g (média = 160,2 g).

A relação entre o comprimento total (CT) e o comprimento padrão (CP) ($R^2 = 0,98$) e a relação peso-comprimento total (CT) ($R^2 = 0,99$) apresentaram forte correlação entre as unidades biométricas para *Epinephelus itajara* juvenil (Figura 3).

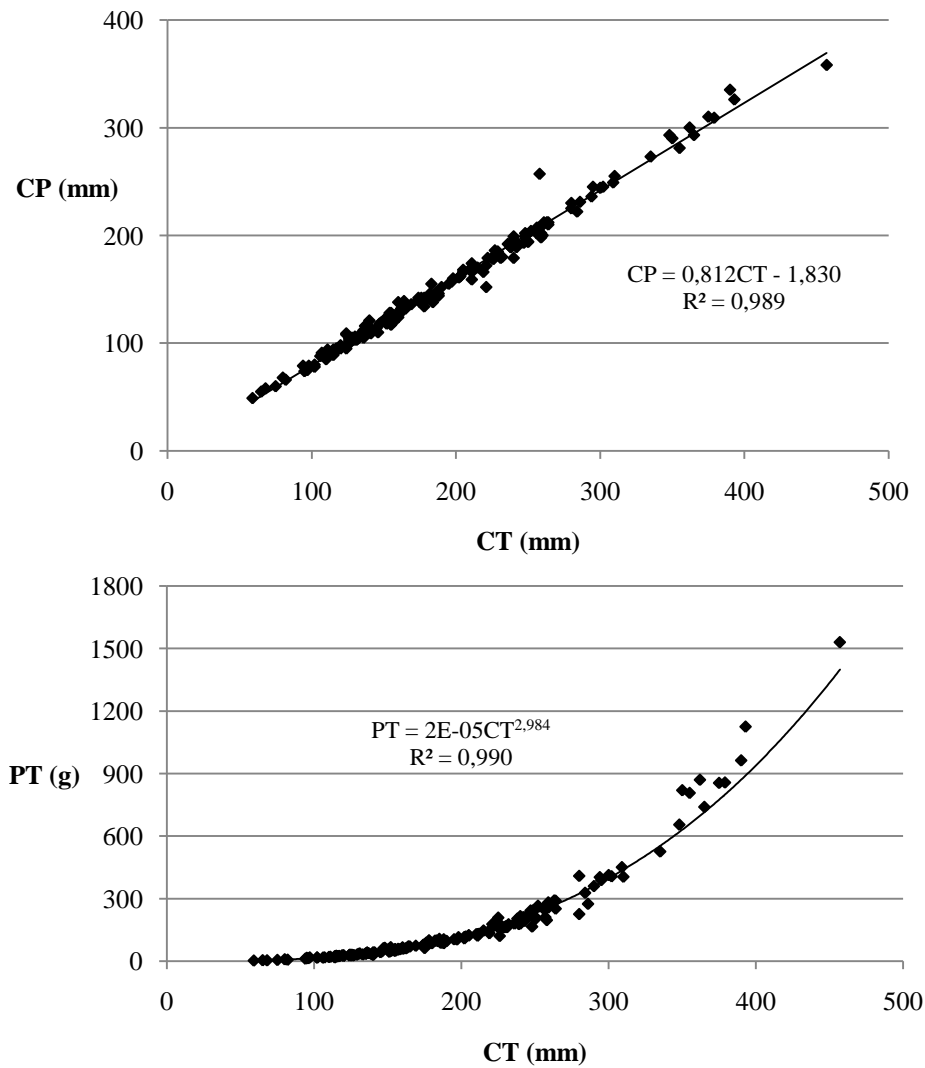


Figura 3. Relação do comprimento total (CT) com o comprimento padrão (CP) (superior) e o peso (PT) (inferior) de *Epinephelus itajara* juvenis em habitat de manguezal na APA de Conceição da Barra entre novembro de 2011 a outubro de 2013 ($N = 162$).

As capturas de meros ocorreram significativamente com maior frequência na estação quente e úmida (verão), entre os meses de novembro a abril (Mann Whitney: $Z(U) = 2,5621$; $p = 0,0104$). O período entre junho a setembro (Kruskal-Wallis: $H = 7,7852$; $p = 0,0204$) apresentou significativamente menor frequência de captura de *Epinephelus itajara* juvenis por armadilha (CPUE) que os períodos entre outubro a janeiro e fevereiro a maio. Os resultados mostram declínio acentuado no número de captura de meros juvenis, a partir de maio atingindo menor captura em julho e máxima captura em novembro. Entre junho a setembro, o número médio de captura de meros juvenis por armadilha (0,11 meros juvenis / armadilha / mês) foi praticamente três vezes menor que outubro a janeiro (0,32 meros juvenis / armadilha / mês) e fevereiro a maio (0,34 meros juvenis / armadilha / mês) (Figura 4).

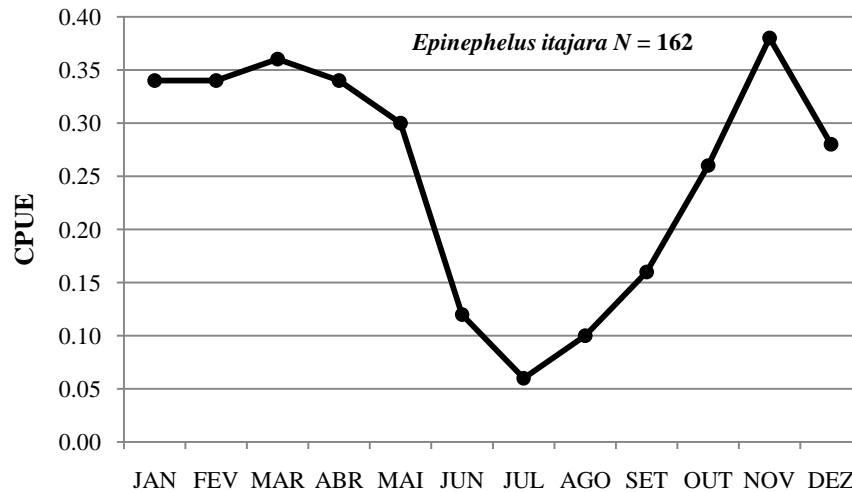


Figura 4. Captura mensal de *Epinephelus itajara* juvenis por armadilha (CPUE) em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição entre novembro de 2011 a outubro de 2013 ($N = 162$).

A frequência das classes de tamanho dos meros juvenis coletados foi principalmente representada por indivíduos entre 100 a 300 mm ($\pm 90\%$). As classes acima de 300 mm foram pouco representadas e nenhum exemplar abaixo de 50 mm foi coletado. A ausência de coletas abaixo de 50 mm e acima de 500 mm provavelmente pode indicar uma seletividade do método de coleta e tamanho das armadilhas (Figura 5).

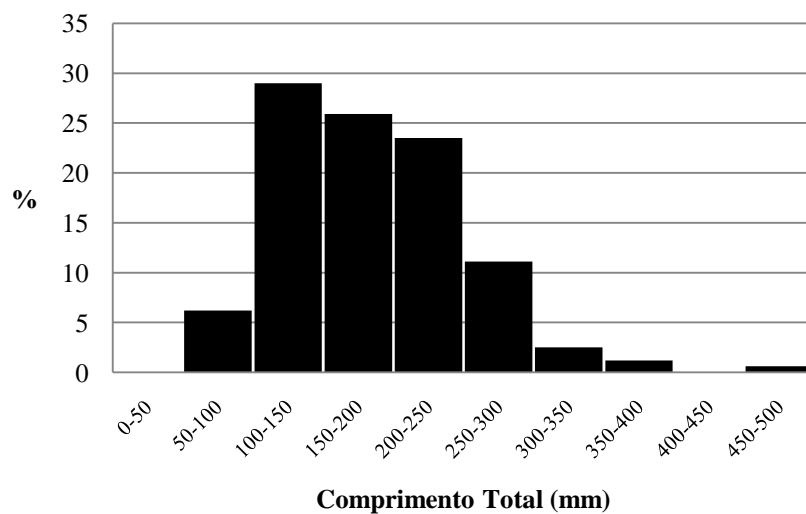


Figura 5. Abundância relativa (%) por classes de tamanhos de *Epinephelus itajara* juvenis capturados em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição (ES) entre novembro de 2011 a outubro de 2013 ($N = 162$).

O comprimento total médio dos meros juvenis capturados, no período de transição entre as estações do verão e inverno foi significativamente ($p < 0,0001$) maior que outros períodos do ano. Os meses entre abril a junho ($N = 41$) apresentou média (Φ) de 219 mm, que é

significativamente maior que nos agrupamentos dos meses de julho a setembro ($N = 17$; $\Phi = 149$ mm; $p < 0,05$), outubro a dezembro ($N = 48$; $\Phi = 175$ mm; $p < 0,05$) e janeiro a março ($N = 56$; $\Phi = 173$ mm; $p < 0,05$) (Figura 6).

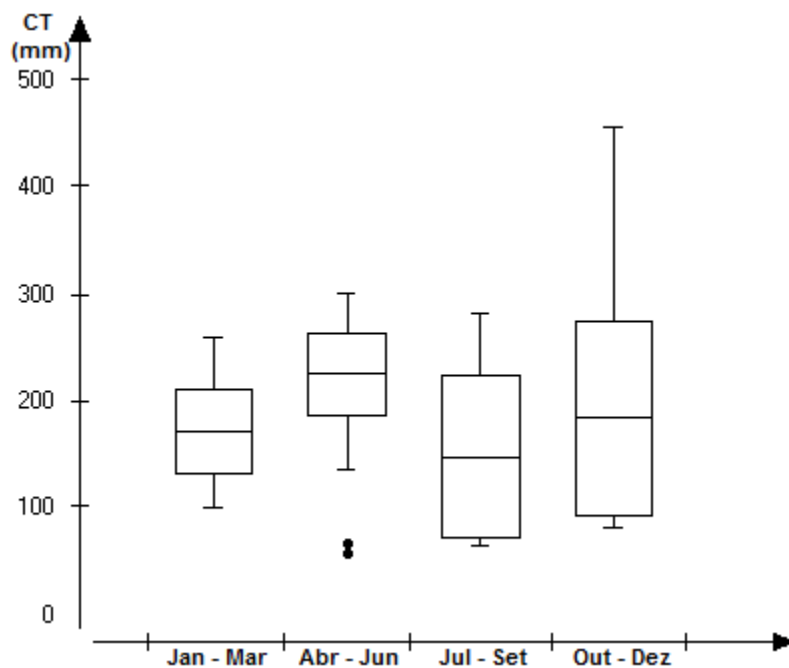


Figura 6. Box plot dos comprimentos totais (CT) em mm de *Epinephelus itajara* juvenis em quatro períodos temporais distintos (1. Jan-Mar; 2. Abr-Jun; 3. Jul-Set e 4. Out-Dez) indicando a média aritmética, desvio padrão e valores extremos (outliers) (●). Períodos temporais são significativamente diferentes ($p < 0,0001$) com média de CT significativamente maior no período de transição (Abr-Jun) entre as estações de verão e inverno em habitat de manguezal no Estuário da APA de Conceição (ES) entre novembro de 2011 a outubro de 2013 ($N = 162$).

DISCUSSÃO

As espécies Epinephelinae ocorrem em muitos habitats similares e provavelmente devem ocorrer sobreposições nos limites ecológicos das espécies. No entanto, características particulares de cada espécie já denotam uma separação de nicho, apesar de serem raros os estudos ecológicos de associação entre as espécies. Os diferentes limites de profundidade e tamanho corporal separam a maioria dos nichos ecológicos das espécies Epinephelinae. Apesar da grande possibilidade de sobreposição nos limites desses nichos, a competição é atenuada por presas diferentes e de tamanhos distintos (Roughgarden 1974).

Os habitats de manguezal foram exclusivamente os principais ambientes registrados nos estudos comparativos sobre *Epinephelus itajara* juvenis em diversos ambientes costeiros (Flórida, Golfo do México, Caribe e Brasil) e raramente encontrados em outros ambientes costeiros analisados para a subfamília Epinephelinae. A frequência de captura em todos os meses do ano, assim como as recapturas obtidas no presente estudo, somada aos estudos realizados anteriormente sobre a biologia de meros juvenis em habitats de manguezais (Botero

& Ospina 2003; Bullock *et al.* 1992; Eklund e Schull 2001; Eklund 2005; Hostim-Silva *et al.* 2005; Frias-Torres 2006; Koenig *et al.* 2007; Cass-Calay & Schmidt 2008; Frias-Torres & Luo 2008; Brusher & Schull 2009 e Lara *et al.* 2009), indicam que estes ambientes são importantes não apenas como áreas de trânsito para os juvenis da espécie, mas sim como habitats fundamentais ao crescimento destes indivíduos durante esta fase de maior vulnerabilidade a predadores.

Para um peixe recrutado em um estuário como pós-larva, o fator principal que direciona a seleção de habitat e a sobrevivência é o risco de predação e a disponibilidade de alimento (Paterson e Whitfield 2000; Laegdsgaard e Johnson 2001). Portanto, os habitats de manguezal claramente fornecem condições fundamentais para *Epinephelus itajara* juvenis, pela abundância de distintas classes, o que não ocorre em outros habitats dos ecossistemas costeiros.

As capturas de *Epinephelus itajara* juvenis foram significativamente menores durante o período mais frio e seco (junho a setembro) no estuário da Área Preservação Ambiental Conceição da Barra (ACB) e corrobora com dados de Sadovy e Eklund (1999) e Eklund e Schull (2001) que identificaram um padrão de baixa frequência de captura de meros juvenis no período de inverno em habitats de manguezal na região da Flórida. No entanto, a baixa captura foi atribuída à diminuição no metabolismo de *E. itajara* em função da queda de temperatura da água, com conseqüente baixa atividade de deslocamento e baixa razão de consumo (Eklund & Schull 2001).

Em estuários tropicais, o regime de chuvas e a salinidade parecem ter maior influência na distribuição e abundância das comunidades de peixes do que a variação na temperatura (Barletta-Bergan *et al.* 2002) e *E. itajara* juvenis parecem ser mais abundantes em ambientes com poucos períodos de hipoxia e menor variação na salinidade (Eklund 2005). Apesar de evidências sugerindo maior importância na variação de temperatura que a precipitação para a abundância da ictiofauna no estuário da ACB (Hostim-Silva *et al. In prep.*), na distribuição e abundância de *E. itajara* juvenis é necessário avaliar com maior critério a interferência de parâmetros oceanográficos (salinidade, oxigênio dissolvido e produtividade primária) (Koenig *et al.* 2007) e da hidrodinâmica. Além disso, há evidências de que as flutuações sazonais nas comunidades da ictiofauna estuarina possam ser induzidas por regime de chuvas, padrões reprodutivos e aumento no recrutamento de peixes na fase pós-larvas através de deslocamentos entre a parte superior e inferior do estuário (Blaber 2000; Barletta *et al.* 2003) ou até o deslocamento para áreas mais profundas afastadas da costa onde a temperatura pode se manter mais constante em períodos de frentes frias (Koenig *et al.* 2011).

A presença significativa de *Epinephelus itajara* juvenis com maior comprimento total médio (CT) no habitat de manguezal, entre abril a junho, provavelmente coincide com os meros juvenis pós-larvas recrutados no ano anterior. Como as larvas pelágicas recém recrutadas, de tamanho reduzido, não foram coletadas pelas armadilhas ou não ocorrem em grande número no

período do verão (janeiro a março) há uma tendência esperada de aumento na média do comprimento total médio antes do recrutamento de novas larvas pelágicas no estuário. Os menores indivíduos coletados pelas armadilhas (58 e 69 mm) foram capturados justamente no mês de junho, indicando a presença de juvenis pós-larvas no estuário. Os tamanhos maiores de *E. itajara* entre abril a junho sugerem capturas mais frequentes de exemplares juvenis recrutados na estação reprodutiva do ano anterior. O que vem corroborar com nossa afirmativa supra de que estes ambientes não servem apenas áreas de trânsito, mas como habitats fundamentais para o crescimento dos meros na fase juvenil.

O período de estabelecimento das larvas pelágicas de *E. itajara* nas áreas estuarinas subtropicais da Flórida foi observado entre 49 (CP: 16 mm) a 112 (CP: 87 mm) dias após a agregação reprodutiva com pico de atividades no verão. Os dados de comprimento padrão (CP) dos menores meros (49 e 58 mm) capturados em junho, no estuário da ACB, comparados com estudo de Lara *et al.* (2009) sincroniza a agregação reprodutiva da ACB entre 80 a 90 dias anteriores que coincide com o final do verão (março) no hemisfério sul tropical.

Os aspectos biológicos e reprodutivos de *E. itajara* em ambientes tropicais são pouco conhecidos, porém nosso estudo traz evidências que corroboram com baixa capturas de meros juvenis no período de inverno (Sadovy e Eklund 1999; Eklund e Schull 2001) e formação de larvas pelágicas durante o período de verão (Bullock *et al.* 1992; Lara *et al.* 2009), como ocorre em áreas subtropicais.

O alto número de capturas (CPUE) e baixo índice no comprimento total médio de *E. itajara* juvenis na ACB no Espírito Santo (Brasil), comparados com outros sistemas de rios e canais de manguezais na Flórida (EUA), descritos por Eklund (2005), podem indicar seletividade no tamanho da armadilha, na estratégia de captura ou indicar que *E. itajara* juvenis na ACB são realmente pequenos.

No Brasil, Giglio e Freitas (2013) caracterizando a ictiofauna por método de pesca tradicional, com cerco de rede em manguezal (camboa) recentemente registraram a captura de oito exemplares juvenis entre 261 a 645 mm de comprimento total durante um ano. A média superior (394 mm) aos dados encontrados na ACB pode indicar a seletividade do método, mas ao mesmo tempo demonstram que a abundância de meros juvenis (> 500mm) em áreas de associadas às raízes manguezais é baixa.

A abundância de *E. itajara* juvenis maiores (> 500mm) que os limites encontrados neste estudo não devem ser atribuído apenas à seletividade do método de captura. Com o aumento no tamanho dos peixes juvenis, o acesso em áreas com estrutura complexa das raízes submersas dos manguezais se torna mais restrito. Desta forma os juvenis maiores, com limitado acesso às fontes de alimento entre as raízes submersas dos manguezais e menos vulneráveis a predadores pelo aumento de tamanho, começam a se afastar da borda densa dos manguezais para áreas mais abertas, buscando refúgios nos fundos lamosos (mudflat) (Laegdsgaard e Johnson 2001).

Dois fatores merecem atenção para serem considerados no estuário da ACB, que pode influenciar na menor média de comprimento total dos meros juvenis em relação a outros habitats de manguezais. Primeiro, pode-se atribuir à pesca predatória, ao uso de redes no interior do estuário. Este método de pesca proibido neste tipo de habitat tem seletivamente retirado peixes maiores de diversas espécies no estuário, além de causar a morte de peixes juvenis de importância comercial, inclusive os meros e tem sido uma prática frequentemente observada na região. Segundo, à intervenção de dragagem do canal principal e construção de moles para conter erosão em áreas adjacentes à foz do estuário. Neste caso os canais secundários de manguezais sofreram acelerado processo de assoreamento nos últimos anos, tornando os canais de acesso para as áreas de manguezais muito rasos (< 1m) e alterando os processos físicos e químicos internos no estuário (Reuss-Strenzel e Assunção 2008), dificultando a permanência de peixes e juvenis maiores nos canais secundários. É importante considerar que juvenis maiores devem se estabelecer ao longo de todo sistema, emigrando-se de habitats de qualidade inferior (Eklund 2005). Esse processo de assoreamento foi intensificado na dragagem, porém, pescadores locais confirmam que os canais secundários eram mais profundos e relatam ter sido comum encontrar meros juvenis grandes próximos do manguezal.

Os dados obtidos neste estudo não são suficientes para caracterizar os manguezais como habitat berçário de *Epinephelus itajara* juvenis, mesmo porque a definição e distinção entre habitats berçários e habitats essenciais são complexos e ainda passíveis de discussão. Beck *et al.* (2001) propuseram adequações que definiriam melhor a utilização do termo. O fundamento chave para definir um habitat berçário implica demonstrar que a contribuição desse habitat por unidade de área, de indivíduos recrutados para população adulta, é maior que a média de outros habitats. Dahlgren *et al.* (2006) complementa sugerindo a aplicação do termo Habitat Juvenil Efetivo (Effective Juvenile Habitat - EJH), que difere do conceito proposto por Beck *et al.* (2001), quando considera que a proporção de indivíduos juvenis que um habitat particular contribui para as populações adultas é independente de sua área de abrangência.

Koenig *et al.* (2007) caracterizaram os manguezais como habitats berçários essenciais, porém argumentam sobre a dificuldade no estabelecimento da contribuição do habitat de manguezal para população relativa de meros adultos. Isto porque a espécie na fase juvenil raramente ocupa outro habitat além do manguezal. Portanto, a medida da abundância regional de meros adultos relacionada com as áreas de manguezais adjacentes pode inferir sobre a contribuição do habitat de manguezal para a população adulta.

A importância dos habitats de manguezal como berçário tem sido uma das principais razões para apoiar a conservação e manejo desses habitats e conter sua rápida perda (Sheridan e Heys 2003). Habitats de manguezais e seagrass provavelmente fornecem estrutura que suportam muitas das espécies de peixes recifais de importância econômica (Nagelkerken *et al.* 2000). Contudo, não é necessário caracterizar um habitat como berçário para determinada espécie,

antes que sejam tomadas medidas de proteção, conservação e restauração desses habitats (Beck *et al.* 2001).

Os dados levantados demonstram que os meros frequentam ativamente os manguezais nos seus estágios iniciais de vida e sugere que este ambiente pode servir como berçário e como habitat relevante durante sua fase juvenil em todos os limites de sua distribuição. O papel dos habitats de manguezal é definitivamente importante na proteção contra predadores, no fornecimento de fontes de alimento e abrigos para as espécies. O grau de dependência e utilização dos manguezais pela ictiofauna em ambientes tropical e subtropical é variável para cada espécie e conforme a natureza associada a cada sistema de manguezal (Sheridan e Hays 2003; Lugendo *et al.* 2006; Nagelkerken *et al.* 2008). Além disso, como os ambientes recifais podem ser muito competitivos pela disponibilidade limitada de espaço, a manutenção do fluxo entre estes habitats e habitats rasos (seagrass e manguezais) pode resultar em maior ganho de biomassa para peixes jovens e adultos e conseqüentemente, maior aptidão para sobrevivência (Parrish 1989).

Os dados referentes à APA de Conceição da Barra, apresentados neste trabalho identificou alta frequência (90%) de meros juvenis entre 100 a 300 mm, o que não ocorreu nos principais estudos pesquisados com juvenis da espécie (Bullock *et al.* 1992; Eklund 2005; Eklund e Schull 2001; Frias-Torres 2006; Koenig *et al.* 2007; Bruscher & Schull, 2008; Murie *et al.* 2008). Neste estudo, os meros juvenis foram capturados ao longo de todos os meses do ano, com frequência de captura significativa no período que compreende a estação quente e chuvosa no Brasil tropical e com tamanhos significativamente maiores no período de transição entre o fim do verão e início do inverno (estação fria e seca).

Os meros juvenis não são limitados por recursos alimentares, mas pela qualidade do habitat disponível (Frias-Torres 2006; Koenig *et al.* 2007), portanto, alterações no habitat devem refletir na distribuição e abundância da espécie. Essas alterações podem ser avaliadas pela abundância da espécie alvo, o que pode influenciar no monitoramento do habitat (Eklund 2005).

A alta abundância de meros juvenis, com média de comprimento total inferior à média de outros habitats estuarinos ao longo de dois anos consecutivos e ausência de meros juvenis maiores de 500 mm, sugere que a ACB pode ter qualidade inferior de sobrevivência de meros juvenis ou alta pressão pela pesca predatória. Lacerda (1993) comenta que a pesca ilegal, com artefatos proibidos e o avanço da ocupação industrial e urbana tem comprometido a qualidade dos habitats de manguezal em diferentes graus de ameaça por toda costa da América Latina.

Desta forma, estas observações são importantes a serem levadas em consideração no momento de propor medidas de proteção integral e recuperação de ambientes costeiros (recifes costeiros e manguezais), controle eficaz da pesca e pesquisas de longo prazo para identificar habitats relevantes que possam servir de berçários e reprodução dos meros.

Apesar da necessária prudência na manutenção da proibição da pesca dos meros na costa brasileira, a medida a longo prazo se tornará ineficaz sem que os habitats de manguezal e a conectividade com habitats recifais dos ciclos de vida das espécies ameaçadas (Vila-Nova *et al.* 2011), não sejam recuperados e protegidos integralmente. Especificamente para *Epinephelus itajara*, um plano efetivo de recuperação, depende da restauração das características físicas e particulares do manguezal (Ogden *et al.* 2005; Koenig *et al.* 2007)

Especificamente as áreas de proteção ambiental (APA) no Brasil, como a APA de Conceição da Barra, tem se mostrado muito frágeis na proteção de espécies ameaçadas. Ao longo de mais de uma década de vigência da proibição de pesca dos meros (*Epinephelus itajara*) na costa brasileira, pouco avanço ocorreu na criação de áreas de proteção integral para preservação e recuperação de áreas de manguezais e áreas costeiras marinhas no Brasil.

Agradecimentos

Os autores do trabalho agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), ao Projeto Meros do Brasil, patrocinado pela Petrobrás S.A. (por meio do Programa Petrobrás Ambiental) e a Transpetro Transportes S.A., pelo apoio financeiros. Agradecimento especial ao Dr. Luiz Fernando Duboc e a Dra. Ana Paula Cazerta Farro (Universidade Federal do Espírito Santo) pelos direcionamentos relevantes da proposta de trabalho e questionamentos nos dados deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-PERERA, A.; AGUILAR-DAVILA, W. 1996. A spawning aggregation of Nassau grouper *Epinephelus striatus* (Pisces: Serranidae) in the Mexican Caribbean. *Environ. Biol. Fish.* 45: 351–361.
- AGUILAR-PERERA, A.; APPELDONRN, R.S. 2008. Spatial distribution of marine fishes along a cross-shelf gradient containing a continuum of mangrove-seagrass-coral reefs off southwestern Puerto Rico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 378-394. DOI: 10.1016/j.ecss.2007.07.016
- AGUILAR-PERERA, A.; SCHÄRER, M. & NEMETH, M. 2006. Occurrence of Juvenile Nassau Grouper, *Epinephelus striatus* (Teleostei: Serranidae), off Mona Island, Puerto Rico: Considerations of Recruitment Potential. *Caribbean Journal of Science* 42(2): 264-267.
- ALBAÑEZ-LUCERO, M.O.; ARREGUÍN-SÁNCHEZ, F. 2009. Modelling the spatial distribution of red grouper (*Epinephelus morio*) at Campeche Bank, México, with respect substrate. *Ecological Modelling* 220: 2744–2750. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2009.07.007
- ALVES, J.A. ; PINHEIRO, P.C. 2011. Peixes recifais das ilhas costeiras do Balneário Barra do Sul – Santa Catarina – Brasil. *Revista CEPESUL - Biodiversidade e Conservação Marinha* 2 (1): 10-21.
- ARAÚJO, J.N. & MARTINS A.S. 2009. Aspects of the population biology of *Cephalopholis fulva* from the central coast of Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 25: 328–334. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2008.01181.x
- BARLETTA, M.; COSTA, M. F. 2009. Living and nonliving resources exploitation in a tropical semi-arid estuary. *Journal of Coastal Research SI* 56: 371–375.
- BARLETTA, M.; BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U. 1998. Description of the fishery structure in the mangrove dominated region of Bragança (State of Pará – North Brazil). *Ecotropica* 4: 41–53.
- BARLETTA, M.; BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U.; HUBOLDT, G. 2003. Seasonal changes in density, biomass, and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (Northern Brazilian coast, East Amazon). *Marine Ecology Progress Series* 256: 217–228.
- BASILIO, T.H.; GODINHO, W.O.; ARAÚJO, M.E.; FURTADO-NETO, M.A.A.; FARIA, V.V. 2009. ICTIOFAUNA DO ESTUÁRIO DO RIO CURU, CEARÁ, BRASIL. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza* 42(2): 81 – 88.
- BECK, M.W.; HECK Jr., K.L.; ABLE, K.W.; CHILDERS, D.L.; EGGLESTON, D.B.; GILLANDERS, B.M.; HALPERN, B.; HAYS, C.G.; HOSHINO, K.; MINELLO, T.J.; ORTH, R.J.; SHERIDAN, P.F.;

- WEINSTEIN, M.P. 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51: 633–641.
- BEETS, J.; HIXON M.A. 1994. Distribution, Persistence and Growth of Groupers (Pisces: Serranidae) on Artificial and Natural Patch Reefs in the Virgin Islands. *Bulletin of Marine Science*. 55(2-3): 470-483.
- BEGOSSI, A.; SALIVONCHYK, S.V.; BARRETO, T.; NORA, V.; SILVANO, R.A.M 2012a. Small-scale Fisheries and Conservation of Dusky Grouper (Garoupa), *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in the Southeastern Brazilian Coast. *Science Journal of Agricultural Research and Management*. Volume 2012, Article ID sjarm-174, 4 Pages, 2012. DOI: 10.7237/sjarm/174
- BLABER, S.J.M. 2000. Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation & conservation. Blackwell, Oxford. 372p.
- BOTERO, J.; OSPINA, J.F. 2003. Crescimento y Desempeño General de Juveniles Silvestres de Mero Guasa *Epinephelus itajara* (Lichtenstein) Mantenidos em Jaulas Flotantes Bajo Diferentes Condiciones de Cultivo. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 32: 25-36.
- BRUSCHER, J.H.; SCHULL, J. 2009. Non-lethal age determination for juvenile goliath grouper (*Epinephelus itajara*) from southwest Florida. *Endangered Species Res.* 7: 205–212. DOI: 10.3354/esr00126
- BULLOCK, L.H.; MURPHY, M.D; GODCHARLES, M.F.; MITCHELL, M.E. 1992. Age, growth, and reproduction of jewfish *Epinephelus itajara* in the eastern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.* 90: 243-249.
- CASS-CALAY, S.L.; SCHMIDT, T.W. 2008. Monitoring changes in the catch rates and abundance of juvenile goliath grouper using the ENP creel survey, 1973–2006. *Endangered Species Research*: 1-11. DOI: 10.3354/esr00139
- CASTRO, A. C. L. 2001. Diversidade da assembléia de peixes em igarapés do estuário do Rio Paciência (MA – Brasil). *Revista Atlântica* 23: 39–46.
- CHAVES, L.C.T.; NUNES, J.A.C.C.; SAMPAIO, C.L.S. 2010. Shallow Reef Fish Communities of South Bahia Coast, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58(special issue IICBBM): 33-46.
- COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C.; SCANLON, K.M.; HEPPELL, S.; HEPPELL, S.; MILLER, M.W. 2010. Benthic Habitat Modification through Excavation by Red Grouper, *Epinephelus morio*, in the Northeastern Gulf of Mexico. *The Open Fish Science Journal* 3:1-15.
- COLIN, P.L.; SADOVY, Y.J.; DOMEIER, M.L. 2003. Manual for the Study and Conservation of Reef Fish Spawning Aggregations. Special Publication. Society for the Conservation of Reef Fish Aggregations No. 1 (Version 1.0). (www.SCRFA.org).
- CONDINI, M.V.; GARCIA, A. M.; VIEIRA, J.P. 2007. Perfil do pescador e descrição da pesca da garoupa (Pisces, Serranidae) no Molhe Oeste da Barra de Rio Grande, RS. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2(3): 279-287.
- CRAIG, M.T., SADOVY DE MITCHESON, Y.J.; HEEMSTRA, P.C. 2012. Groupers of the World: A Field and Market Guide, CRC Press. 424p.
- CUNHA, F.E.A.; MONTEIRO-NETO, C.; NOTTINGHAM, M.C. 2007. Temporal and spatial variations in tidepool fish assemblages of the northeast coast of Brazil. *Biota Neotropica* 7(1).
- DAHLGREN, C.P.; KELLISON, G.T.; ADAMS, A.J.; GILLANDERS, B.M.; KENDALL, M.S.; LAYMAN, C.A.; LEY, J.A.; NAGELKERKEN, I.; SERAFY, J.E. 2006. Marine nurseries and effective juvenile habitats: concepts and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312: 291–295.
- DAROS, F.A.; BUENO, L.S.; VILAR, C.C.; PASSOS, A.C.; SPACH, H.L. 2012. Checklist of rocky reef fishes from the Currais Archipelago and Itacolomis Island, Paraná state, Brazil. *Check List* 8(3): 349-354.
- EGGLESTON, D.B. 1995. Recruitment in Nassau grouper *Epinephelus striatus*: post-settlement abundance, microhabitat features, and ontogenetic habitat shifts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124:9-22.
- EKLUND, A.M. 2005. Habitats Affinities of Juvenile Goliath Grouper to Assess Estuarine Conditions. In: Bortone S.A. (ed) *Estuarine Indicators*. CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap.25 p. 393-407.
- EKLUND, A.M. & J. SCHULL 2001. A stepwise approach to investigate the movement patterns and habitat utilization of goliath grouper, *Epinephelus itajara*, using conventional tagging, acoustic telemetry and satellite tracking. Pages 189–216 in J. R. Sibert and J. L. Nielsen, eds. *Electronic tagging and tracking in marine fisheries*. Springer-Verlag, New York.
- FARMER, N.A.; KARNAUSKAS, M. 2013. Spatial Distribution and Conservation of Speckled Hind and Warsaw Grouper in the Atlantic Ocean off the Southeastern U.S.. *PLoS ONE* 8(11): e78682. DOI:10.1371/journal.pone.0078682
- FAUNCE, C.H.; SERAFY, J.E. 2006. Mangroves as fish habitat: 50 years of field studies. *Marine Ecology Progress Series* 318: 1–18.

- FERREIRA, C.E.L.; GONÇALVES, J.E.A.; COUTINHO, R. 2001. Community structure of fish and habitat complexity on a tropical rocky shore. *Environmental Biology of Fishes* 61: 353-369.
- FERREIRA, B.P.; M. HOSTIM-SILVA; L.C. GERHARDINGER; A.B. ANDRADE 2006. Investigación y conservación de Meros en Brasil: Grupo de Especialistas en Meros y Lábridos (GWSG) de la UICN. Boletín Especies Amenazadas América del Sur UICN.
- 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.
- FRIAS-TORRES, S. 2006. Habitat Use of Juvenile Goliath Grouper *Epinephelus itajara* in the Florida Keys, USA. *Endangered Species Research (ESR) 1*: 1-6.
- FRIAS-TORRES, S.; LUO, J. 2008. Using dual-frequency sonar to detect juvenile goliath grouper *Epinephelus itajara* in mangrove habitat. *Endangered Species Research (ESR) 1*: 1-6. DOI: 10.3354/esr00138
- GIBRAN, F.Z. 2007. Activity, habitat use, feeding behavior, and diet of four sympatric species of Serranidae (Actinopterygii: Perciformes) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 5(3): 387-398.
- GIGLIO, V.J.; FREITAS, M.O. 2013. Caracterização da pesca artesanal com rede de camboa na Reserva Extrativista de Cassurubá, Bahia. *Biotemas* 26 (2): 249-259. DOI: 10.5007/2175-7925.2013v26n2p249
- GRAY, J.S. 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* 6: 153-175.
- HACKRADT, C.W.; FÉLIX-HACKRADT, F.C. 2009. Assembléia de peixes associados a ambientes consolidados no litoral do Paraná, Brasil: uma análise qualitativa com notas sobre sua bioecologia. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49(31): 389-403.
- HACKRADT, C.W.; FÉLIX-HACKRADT, F.C.; GARCIA-CHARTON, J.A. 2011. Influence of habitat structure on fish assemblage of an artificial reef in southern Brazil. *Marine Environmental Research* 72: 235-247. DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.09.006
- HARMELIN, J.; HARMELIN-VIVIEN, M. 1999. A review on habitat, diet and growth of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Marine Life* 9(2): 11-20.
- HEEMSTRA, P.C.; RANDALL, J.E. 1993. Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome: Food and Agriculture Organization, 16(125): 382 p.
- HIXON, M.A.; CARR, M.H. 1997. Synergistic predation, density dependence, and population regulation in marine fish. *Science* 277: 946-949.
- HONORIO, P.P.F.; RAMOS, R.T.C. 2010. Fishes of Sapatas Reef Northeastern Brazil. *Revista Nordestina de Biologia* 19(2): 25-34.
- HOSTIM-SILVA, M.; ANDRADE, A.B.; GERHARDINGER, L.C.; MACHADO, L.F. 2005. The Lord of the Rocks conservation program in Brazil: the need for a new perception of marine fishes. *Coral Reefs* 24: 74.
- HOSTIM-SILVA, M.; LIMA, A.C.; SPACH, H.L.; PASSOS, A.C.; SOUZA, J.D. 2013. Estuarine demersal fish assemblage from a transition region between the tropics and the subtropics of the South Atlantic. *Biotemas* 26 (3): 153-161. DOI: 10.5007/2175-7925.2013v26n3p153
- HUGHES, T.P.; BELLWOOD, D.R.; FOLKE, C. STENECK R.S. & WILSON, J. 2005. New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20 (7): 380-386. DOI: 10.1016/j.tree.2005.03.022
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 October 2013.
- JACKSON, J.B.C. 2001. What was natural in the coastal oceans? PNAS 98(10): 5411-5418. DOI: 10.1073ypnas.091092898
- JONES, R.S.; GUTHERZ, E.J.; NELSON, W.R.; MATLOCK, G.C. 1989. Burrow utilization by yellowedge grouper, *Epinephelus flavolimbatus*, in the northwestern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 26: 277-284.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C. 1998. Absolute abundance and survival of juvenile gags in sea grass beds of the northeastern Gulf of Mexico. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 44-55.
- KOENIG, C.C.; COLIN, P.L. 1999. Absolute abundance and survival of juvenile Gag, *Mycteroperca microlepis* (Pisces: Serranidae) in seagrass beds on the Northeastern Gulf of México. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 45: 37-54.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; GRIMES, C.B.; FITZHUGH, G.R.; SCANLON, K.M.; GLEDHILL, C.T.; GRACE, M. 2000. Protection of fish spawning habitat for the conservation of warm-temperate reef-fish fisheries of shelf-edge reefs of Florida. *Bull. Mar. Sci.* 66: 593-616.

- KOENIG, C.C.; F.C. COLEMAN; A.M. EKLUND; J. SCHULL & J. UELAND 2007. Mangroves as Essential Nursery Habitat for Goliath Grouper (*Epinephelus itajara*). *Bulletin of Marine Science* 80(3): 567-586.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; KINGON, K. 2011. Pattern of recovery of the goliath grouper *Epinephelus itajara* population in the southeastern US. *Bulletin of Marine Science* 87(4):891-911. DOI: <http://dx.doi.org/10.5343/bms.2010.1056>
- LA MESA, G.; LOUISY, P. & VACCHI, M. 2002. Assessment of microhabitat preferences in juvenile dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) by visual sampling. *Mar. Biol., Berlin* 140: 175-185. DOI: 10.1007/s002270100682
- LACERDA, L.D. (Ed.) 1993. *Conservation and sustainable utilization of mangrove forests in Latin America and Africa regions*. v.2. Mangrove Ecosystems Technical Reports, Okinawa: ITTO/ISME, Japan, p.245-272.
- LAEGDSGAARD, P.; JOHNSON, C.R. 2001. Why do juvenile fish utilize mangrove habitats? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257: 229-253.
- LARA, M.R.; J. SCHULL; D.L. JONES & R. ALLMAN 2009. Early life history stages of goliath grouper *Epinephelus itajara* (Pisces: Epinephelidae) from Ten Thousand Islands, Florida. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 221-228.
- LEGARE, B.; MAIZE, K.; NEMETH, R. 2011. Juvenile Nassau Grouper (*Epinephelus striatus*) Utilization of Nearshore Habitats with Evidence of Adult Connectivity to a Spawning Aggregation Site. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 63: 198-199.
- LÓPES-RIVERA, M.M. & SABAT A.M. 2009. Effects of a marine fishery reserve and habitat characteristics in the abundance and demography of the red hind grouper, *Epinephelus guttatus* *Caribbean Journal of Science* 45(2-3) 348-362.
- LUGENDO, B.R.; NAGELKERKEN, I.; VAN DER VELDE, G.; MGAYA, Y.D. 2006. The importance of mangroves, mud/sand flats and seagrass beds as feeding areas for juvenile fish in Chwaka Bay, Zanzibar: gut content and stable isotope analysis. *J. Fish Biol.* 69: 1639-1661. DOI::10.1111/j.1095-8649.2006.01231.x
- LUIZ JR., O. J.; CARVALHO-FILHO, A.; FERREIRA, C. E. L.; FLOETER, S. R.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. 2008. The reef fish assemblage of the Laje de Santos Marine State Park, Southwestern Atlantic: annotated checklist with comments on abundance, distribution, trophic structure, symbiotic associations, and conservation. *Zootaxa, Auckland* 1807: 1-25.
- MACHADO, L.F.; BERTONCINI, A.A.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J.P. 2003. Habitat use by the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and its relative abundance, in Santa Catarina, Brazil. *Aqua. J. Ichthyol. Aquatic Biol.* 6(4): 133-138.
- MARQUES, S. & FERREIRA, B.P. 2011. Sexual development and reproductive pattern of the Mutton hamlet, *Alphesthes afer* (Teleostei: Epinephelidae): a dyandric, hermaphroditic reef fish. *Neotropical Ichthyology* 9(3): 547-558.
- McCLENACHAN, L. 2009. Historical declines of goliath grouper populations in South Florida, USA. *Endangered Species Research*: 1-7. DOI: 10.3354/esr00167
- MEDEIROS, D.V.; NUNES, J.A.C.C.; SAMPAIO, C.L.S. 2009. A mutton hamlet *alphesthes afer* (Bloch, 1793) reproductive event in northeast Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Science* 4(2): 212-215.
- MEJÍA-LADINO, L.M.; BETANCUR-R., R.; ACERO P., A.; GRIJALBA B., M. 2003. Presencia de *Epinephelus nigrilus* (Pisces: Serranidae) em el Caribe Colombiano, Incluyendo una Clave para las Especies de *Epinephelus* em el Área. *Boletín Ecológico: Ecosistemas Tropicales* 37: 31-39.
- MUNRO, J.L.; BLOK, L. 2005. The Status of Stocks of Groupers and Hinds in the Northeastern Caribbean. *of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 56: 283-294.
- MURIE, D.; PARKYN, D.; KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; SCHULL, J.; FRIAS-TORRES, S. 2009. Evaluation of finrays as a non-lethal ageing method for protected goliath grouper *Epinephelus itajara* in Florida. *Endangered Species Res.* 7: 213-220. DOI: 10.3354/esr00146
- NAGELKERKEN, I.; DORENBOSCH, M.; VERBERK, W.C.E.P.; COCHERET DE LA MONIÈRE, E.; VAN DER VELDE, G. 2000. Importance of shallow-water biotopes of a Caribbean bay for juvenile coral reef fishes: patterns in biotope association, community structure and spatial distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 202: 175-192.
- NAGELKERKEN, I.; BLABER, S.J.M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L.G.; MEYNECKE, J.O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H.M.; SASEKUMAR, A.; SOMERFIELD, P.J. 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany* 89: 155-185. DOI: 10.1016/j.aquabot.2007.12.007
- NEMETH, R.S.; KADISON, E.; HERZLIEB, S.; BLONDEAU, J.; WHITEMAN, E.A. 2006. Status of a yellowfin (*Mycteroperca venenosa*) grouper spawning aggregation in the US Virgin Islands with notes on other species. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 57: 541-558.

- OGDEN, J.C.; DAVIS, S.M.; BARNES, T.K.; JACOBS, K.J.; GENTILE, J.H. 2005. Total system conceptual ecological model. *Wetlands* 25: 955–979.
- OLIVEIRA, I.M.; HAZIN, F.; OLIVEIRA, V.S.; GEBER, F.; OLIVEIRA, G.J.; BARRADAS, R. 2007. Distribuição e Abundância Relativa de Peixes Capturados com Espinhel de Fundo na Costa de Pernambuco, Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo 33(2): 183-193.
- OSÓRIO, F.M.; GODINHO, W.O.G.; LOTUFO, T.M.C. 2011. Ictiofauna associada às raízes de mangue do estuário do Rio Pacoti – CE, Brasil. *Biota Neotrop.* 11(1): 415-420.
- PAIVA, A.C.G.; CHAVES, P.T.C.; ARAÚJO, M.E. 2008. Estrutura e organização trófica da ictiofauna de águas rasas em um estuário tropical. *Rev. Bras. Zool.* 25(4):647-661.
- PARRISH, J.D. 1989. Fish communities of interacting shallow-water habitats in tropical oceanic regions. *Marine Ecology Progress Series* 58: 143-160.
- PATERSON, A. W.; WHITFIELD, A. K. 2000. Do shallow-water habitats function as refugia for juvenile fishes? *Estuarine Coastal and Shelf Science, Amsterdam* 51: 359-364.
- PAULY, D.; CHRISTENSEN, V.; SYLVIE, G.; PITCHER, T.J.; SUMAILA, U.R.; WALTERS, C.J.; WATSON, R.; ZELLER, D. 2002. Towards sustainability in world fisheries. *Nature* 418: 689-695.
- PHELAN, M.J. 2008. Report on the Goliath Grouper Aggregation and Spawning Monitoring at Jupiter, Florida. Unpublished report, Florida Oceanographic Coastal center. Hutchinson Island, Florida. 21 pp.
- PINHEIRO, H.T.; CAMILATO, V.; GASPARINI, J.L.; JOYEUX, J.C. 2009. New records of fishes for Trindade-Martin Vaz oceanic insular complex, Brazil. *Zootaxa* 2298: 45–54
- REUSS-STRENZEL, G.M.; ASSUNÇÃO, M.F. 2008. Etnoconhecimento ecológico dos caçadores submarinos de Ilhéus, Bahia, como subsídio à preservação do mero (*Epinephelus itajara* Lichtenstein, 1822). *Revista da Gestão Costeira Integrada* 8(2):203-219.
- REYNAL, L.; DRUAULT-AUBIN, V.; LAGIN, A. & RIVOALEN, J.J. 2004. Fishing on Spawning Aggregation Sites of Groupers in Martinique (Mutton hamlet – *Alphistes afer*. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 55: 608-613.
- ROCHA, M.S.P.; MOURÃO, J.S.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D.; ALVES, R.R.N. 2008. O Uso dos Recursos Pesqueiros no Estuário do Rio Mamanguape, Estado da Paraíba, Brasil. *Interciência* 33(12): 903-909.
- ROCHA, M.L.C.F.; FERNANDEZ, W.S.; FILHO, A.M.P. 2010. Spatial and Temporal Distribution of Fish in Palmas Bay, Ubatuba, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58(1): 31-43.
- ROOKER, J.R.; DOKKEN, Q.R.; PATTENGILL, C.V.; HOLT, G.J. 1997. Fish assemblages on natural and artificial reefs in the Flower Garden Banks National Marine Sanctuary, USA. *Coral Reefs* 16: 83–92.
- ROSS, S.W.; MOSER, M.L. 1995. Life History of Juvenile Gag, *Myteroperca microlepis*, in North Carolina Estuaries. *Bulletin of Marine Science* 56(1): 222-237.
- ROUGHGARDEN, J. 1974. Species packing and the competition function with illustrations from coral reef fish. *Theoretical Population Biology* 5:163-186.
- SADOVY, Y. 1994. Grouper stocks in the western central Atlantic: the need for management and management needs. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 43: 43-64.
- SADOVY, Y.; ROSARIO, A.; ROMAN, A. 1994. Reproduction in an aggregating grouper, the red hind *Epinephelus guttatus*. *Envir. Biol. Fish* 41: 269-286.
- SADOVY, Y. & A.M. EKLUND, A.M. 1999. Synopsis of biological information on the Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, (Bloch 1792), and the jewfish, *E. itajara* (Lichtenstein 1822). NOAA Technical Report, NMFS 146, and FAO Fisheries Synopsis 157. 65 p.
- SAZIMA, I.; KRAJEWSKE, J.P.; BONALDO, R.M.; SAZIMA, C. 2005. Wolf in a sheep's clothes: juvenile coney (*Cephalopholis fulva*) as an aggressive mimic of the brown chromis (*Chromis multilineata*) *Neotropical Ichthyology* 3(2):315-318.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G. & ADAIME, R.R. 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries* 13(2): 201-218.
- SEITZ, R.D., WENNHAGE, H., BERGSTRÖM, U., LIPCIUS, R.N., and YSEBAERT, T. 2013. Ecological value of coastal habitats for commercially and ecologically important species. *ICES Journal of Marine Science*. DOI:10.1093/icesjms/fst152.
- SHERIDAN, P.; HAYS, C. 2003. Are mangroves nursery habitat for transient fishes and decapods? *Wetlands* 23: 449–458
- SIMON, T.; PINHEIRO, H.T.; JOYEUX, J.C. 2011. Target fishes on artificial reefs: Evidences of impacts over nearby natural environments. *Science of the Total Environment* 409 (2011) 4579–4584. DOI:10.1016/j.scitotenv.2011.07.057
- SILVA, M.A.B.; E. BERNINI & T.M.S. CARMO 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta Bot. Brasil.* 19(3):465-471.

- SLUKA, R.D.; CHIAPPONE, M.; SULLIVAN SEALEY, K.M. 2001. Influence of habitat on grouper abundance in the Florida Keys, U.S.A. *Journal of Fish Biology* 58: 682–700. DOI:10.1006/jfbi.2000.1478
- SPALDING, M.D.; FOX, H.E.; ALLEN, G.R.; DAVIDSON, N.; FERDAÑA, Z.A.; FINLAYSON, M.; HALPERN, B.S.; JORGE, M.A.; LOMBANA, A.; LOURIE, S.A.; MARTIN, K.D.; MCMANUS, E. MOLNAR, J. RECCHIA, C.A. & ROBERTSON, J. 2007. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57(7): 573-583. DOI: <http://dx.doi.org/10.1641/B570707>
- STEWART, B.D.; JONES, G.P., 2001. Associations between the abundance of piscivorous fishes and their prey on coral reefs: implications for prey fish mortality. *Mar. Biol.* 138, 383– 397.
- VILA-NOVA, D.A.; BENDER, M.G.; CARVALHO-FILHO, A.; FERREIRA, C.E.L.; FLOETER, S.R. 2011. The Use of Non-reef Habitats by Brazilian Reef Fish Species: Considerations for the Design of Marine Protected Areas. *Natureza & Conservação* 9(1): 1-8DOI: 10.4322/natcon.00901001
- VILAR, C.C.; SPACH, H.L.; SANTOS, L.O. 2011. Fish fauna of Baía da Babitonga (southern Brazil), with remarks on species abundance, ontogenic stage and conservation status. *Zootaxa* 2734: 40–52.
- VILAR, C.C.; JOYEUX, J.C.; GIARRIZZO, T.; SPACH, H.L.; VIEIRA, J.P.; VASKE-JUNIOR, T. 2013. Local and regional ecological drivers of fish assemblages in Brazilian estuaries. *Marine Ecology Progress Series* 485: 181–197.
- XIMENES-CARVALHO, M.O.; FONTELES-FILHO, A.A.; TUBINO, R.A.; ANDRADE-TUBINO, M.F.; PAIVA, M.P. 1999. Parâmetros de Crescimento e Mortalidade do Chérne, *Epinephelus niveatus* (Valenciennes) (Osteichthyes: Serranidae), no Sudeste do Brasil. *Arq. Ciên. Mar.* 32: 111-117.
- WAYCOTT, M.; DUARTE, C.M.; CARRUTHERS, T.J.B.; ORTH, R.J.; DENNISON, W.C.; OLYARNIK, S.; CALLADINE, A. FOURQUREAN, J.W.; HECK Jr.; HUGHES, A.R.; KENDRICK, G.A. KENWORTHY, W.J.; SHORT, F.T.; WILLIAMS, S.L. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *PNAS* 106(30): 12377–12381. DOI: 10.1073_pnas.0905620106.
- WHAYLEN, L.; PATTENGILL-SEMMENS, C.V.; SEMMENS, B.X.; BUSH, P.G.; BOARDMAN, M.R. 2004. Observations of a Nassau Grouper (*Epinephelus striatus*) Spawning Aggregation Site In Little Cayman, Including Multi-Species Spawning Information. *Environ. Biol. Fish.* 70: 305-313.

Capítulo 2: Estrutura Genética e História Populacional Inferida pela Análise das Sequências do DNA Mitocondrial de Atlantic Goliath Grouper (*Epinephelus itajara*)

Damasceno, J.S.¹; Morales, M.J.A.²; Oliveira, C.²; Ferreira, B.P.³; Farro, A.P.C.⁴ and Hostim-Silva, M.⁴

¹ Departamento de Oceanografia e Ecologia, Base Oceanográfica, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz, ES, Brazil*

² Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

³ Departamento de Oceanografia, UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁴ Departamento de Ciências da Saúde, Agrárias e Biológicas, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil

Corresponding author: Júnio Damasceno de Souza (jdamascenobh@gmail.com)

RESUMO

O mero *Epinephelus itajara* está como espécie criticamente ameaçada em todo seu limite de distribuição nos habitats costeiros estuarinos e recifais. A pesca e destruição dos habitats são as principais ameaças. Apesar da urgente necessidade de proteção da espécie os estudos genéticos são raros e o status de conservação genético da espécie ainda é pouco conhecido. O presente estudo faz uma caracterização populacional genética dos meros (*Epinephelus itajara*) a partir de dois marcadores mitocondriais (Cyt *b* e D-Loop), para assim determinar se esta espécie pode dispersar por longas distâncias mantendo o fluxo genético entre os grupos populacionais ou se o transporte larval é limitado. O estudo analisou as hipóteses de população única ou subdivisão na genética populacional de *E. itajara*, indicativos do fluxo e da diversidade genética entre os estuários, como forma de avaliar o status de conservação da espécie na sua área de distribuição especialmente na costa do Brasil. Os resultados da genética populacional indicaram moderada a alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica provavelmente associada à colonização recente, com grande número de haplótipos raros predominantemente com passos mutacionais únicos. Os dados não revelaram estruturação populacional, no entanto, variação genética significativa para ambos os marcadores foi encontrada entre as unidades populacionais da Bahia com Espírito Santo apesar da proximidade geográfica, indicando a presença de barreira para o fluxo genético. Variações genéticas significativas pelo marcador D-Loop foram observadas entre o Pará e a Bahia em relação a maior parte das unidades populacionais. Não houve correlação significativa de divergências genéticas e a distância geográfica entre as unidades populacionais analisadas.

Palavras chaves: Genética populacional, espécie ameaçada, fluxo genético, Epinephelinae

INTRODUÇÃO

O mero *Epinephelus itajara* (Lichtenstein, 1822) é a maior das garoupas do Oceano Atlântico (> 400 kg). É encontrado em águas tropicais e subtropicais do Atlântico Oeste, da Flórida ao sul do Brasil, incluindo o Golfo do México e o Caribe e ao longo da costa oeste africana, do Congo ao Senegal (Heemstra e Randall 1993; Craig *et al.* 2012). A espécie habita águas marinhas e salobras e está associada a substratos complexos e duros com recifes, saliências de rochas, fundos rochosos, faixas de manguezais e navios naufragados (Gerhardinger *et al.* 2006). Os meros adultos ocorrem em recifes com profundidades menores que 50m, enquanto juvenis de *Epinephelus itajaras* são bentônicos, ocupando estuários e linhas costeiras com manguezais (Eklund e Schull 2001).

O crescimento lento, longevidade e características comportamentais como tendência de formar agregações reprodutivas fazem as populações de meros tornarem-se susceptíveis à pressão da pesca (Bullock *et al.* 1992; Koenig *et al.* 2011). Os meros adultos e juvenis demonstram característica de fidelidade de local e são mais ativos durante o período de verão pelo aumento da temperatura da água, porém, não há evidências de migração e um padrão temporal definido para a presença e ausência dos meros juvenis (Eklund e Schull 2001; Koenig *et al.* 2007). Migrações reprodutivas para locais chave definidos, como observados para várias espécies da subfamília Epinephelinae (Sadovy *et al.* 1994; Aguilar-Perera e Aguilar-Davila 1996; Sedberry *et al.* 2006; Coleman *et al.* 2011), não foram totalmente esclarecidas para *Epinephelus itajara* (Colin *et al.* 1990; Mann *et al.* 2008), mas há evidências, por marcações de indivíduos, que agregações reprodutivas de *E. itajara* ocorram em locais particulares, onde adultos podem realizar movimentos periódicos a longas distâncias, para regiões afastadas da costa (Pina-Amargós e González-Sansón 2009).

O ciclo de vida de *E. itajara* inclui mudanças ontogenéticas com as larvas marinhas pelágicas ocorrendo da zona costeira para ambientes mais rasos. A duração do período larval planctônico do mero pode variar entre 30 a 80 dias após a desova (Lara *et al.* 2009).

Como a dispersão de larvas pelágicas está correlacionada à conectividade entre os ambientes, provavelmente depende de regimes oceanográficos locais, atributos da biologia larval e aspectos do comportamento reprodutivo dos adultos que facilitam o recrutamento local (Mora e Sale 2002). A fase larval extensa sugere que os peixes possam exibir altos níveis de dispersão e como resultado podem mostrar falta de estrutura de estoque em escala oceânica, regional e subregional (Aboim *et al.* 2005). A retenção larval por espécie de desova agregada pode ser seletivamente vantajosa para assegurar que a larva e os juvenis tenham acesso aos recursos necessários, porém a alta dispersão e a maior conectividade pode não garantir fluxo genético homogêneo (Portnoy *et al.* 2013).

Os primeiros dados genéticos sobre garoupas, badejos e meros dos gêneros *Epinephelus* e *Mycteroperca* no Atlântico surgiram no final da década de 1990 com os trabalhos de estrutura populacional com DNA mitocondrial (Richardson e Gold 1997; Gold e Richardson 1998) e microssatélites (Stevenson *et al.* 1998; Chapman *et al.* 1999). Recentemente, estudos de filogenia molecular da subfamília Epinephelinae (Craig e Hastings 2007), filogeografia de *E. itajara* (Craig *et al.* 2009) e DNA Barcoding (Torres *et al.* 2013) acrescentaram novos conhecimentos para *Epinephelus itajara*.

As informações sobre a caracterização genética e estrutura populacional para *Epinephelus*, *Mycteroperca* e outros Serranidae no Atlântico tiveram maior importância nos últimos 15 anos a partir dos estudos de Ward *et al.* (2002), Carlin *et al.* (2003), Zatcoff *et al.* (2004); Maggio *et al.* (2006) e Rivera *et al.* (2011), sendo os trabalhos de Silva-Oliveira *et al.* (2008) e Benevides (2011) especificamente sobre *E. itajara*. Com os primeiros trabalhos,

surgiram os primeiros marcadores nucleares específicos da subfamília Epinephelinae, incluindo das espécies ameaçadas pela pesca comercial, dentre elas *E. itajara* (Zatcoff *et al.* 2002; Ramírez *et al.* 2006; Silva-Oliveira *et al.* 2012; Seyoum *et al.* 2013).

No Brasil, como na maior parte do mundo, os grandes meros se encontram sob ameaça, com populações decrescentes, resultado da pressão pesqueira e da degradação do habitat (Ferreira *et al.* 2006). A lista da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) apresenta *E. itajara* como uma espécie criticamente ameaçada (IUCN 2013). No Brasil, a Normativa Interministerial 13/2012 publicada pelo Ministério do Meio Ambiente e pelo Ministério da Pesca e Aquicultura estabeleceu proibição de pesca até 2015.

Ferreira e Maida (1995) destacaram a escassez dos estudos sobre ciclos de vida ou abundância dos meros no Brasil, no entanto, quase duas décadas depois, poucos avanços científicos foram produzidos no Brasil e praticamente em quase todo seu limite de distribuição no Atlântico Tropical e Subtropical. Desde a vigência da última moratória de proibição da pesca em 2012, os trabalhos científicos foram vistos como prioridade máxima para contribuir com o conhecimento e a conservação de *E. itajara*. Ainda assim, a dinâmica populacional de *E. itajara* é pouco conhecida e muitos questionamentos ainda não foram totalmente solucionados no que diz respeito à caracterização populacional genética dos meros e a certificação do status de conservação destes estoques ao longo da costa brasileira.

O presente estudo verificou a existência de estruturação populacional genética dos meros (*Epinephelus itajara*), para assim determinar se esta espécie pode dispersar por longas distâncias mantendo o fluxo genético entre os grupos populacionais ou se o transporte larval é limitado. O estudo analisou as hipóteses de população única ou subdivisão na genética populacional de *Epinephelus itajara* (meros), indicativos do fluxo e da diversidade genética entre os estuários, como forma de avaliar o status de conservação da espécie na sua área de distribuição, especialmente na costa do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Material

Um total de 218 indivíduos da espécie *E. itajara* foi analisado, sendo que as amostras foram obtidas nas seguintes localidades: Pará ($N = 10$); Pernambuco ($N = 25$); Sergipe ($N = 14$); Bahia ($N = 50$); Espírito Santo ($N = 114$); Santa Catarina ($N = 5$) (Tabela I).

Amostras da nadadeira caudal de exemplares juvenis capturados foram retiradas pelo método descrito por Wasko *et al.* (1993). Os exemplares foram pesados e medidos (comprimento total e padrão), sendo em seguida, marcados e soltos na área de captura. A marcação foi efetuada através de etiquetas plásticas específicas numeradas (tags T-anchor). Os

tecidos para estudo genético foram conservados em álcool PA 95% e posteriormente armazenados a -20°C.

Tabela I. Número de exemplares (N) de *Epinephelus itajara* (mero) obtidos para cada localidade na costa brasileira.

Estuário	N	Localidade	Coordenadas
Península Bragantina	10	Bragança (PA)	00°58' S – 46°42' O
APA Costa dos Corais	25	Tamandaré (PE)	08°41' S – 35°06' O
Delta do Rio São Francisco	14	Vaza Barris (SE)	11°08' S – 37°10' O
Rio Caravelas	50	Caravelas (BA)	17°43' S – 39°16' O
APA de Conceição da Barra	114	Conceição da Barra (ES)	18°36' S – 39°44' O
Baía de Babitonga	5	São Francisco do Sul (SC)	26°16' S – 48°42' O

Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo protocolo de extração salina descrito por Aljanabi e Martinez (1997). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop2000®. As amplificações dos genes mitocondriais Citocromo b (*Cyt b*) e a Região Controle (D-Loop) foram realizadas utilizando-se 12,5 µL de volume total de reação: 1X de buffer da enzima Taq DNA polimerase (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 1,5mM MgCl₂; 0,2mM dNTP; 1 unidade da enzima Taq DNA Polimerase (PHT Phoneutria®), 10 ng/µL de DNA e 0,2µM de primers. Os primers *Cyt b* foram itaCB F: 5'- CTA CAA AAA CCC TAT CAATGA CC-3' e itaCB R: 5'- GGT GAA GTT GTC TGG GTC-3' (Craig *et al.* 2009) e os primers D-Loop foram DLB1: 5'- AGC RYC GGT CTT GTA ATC CG – 3' e DLB2: 5'- GGY YCA TCT TGA CAT CTT CAG – 3'.

O gene *Cyt b* foi amplificado nas seguintes condições: 94°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 49°C por 30 s e extensão a 68°C por 45 s; com extensão final de 68°C a 3 minutos. O D-Loop foi amplificado a 95°C por 5 min; 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 68°C por 1 min; com extensão final de 68°C a 5 minutos.

Os segmentos do DNA foram visualizados em gel de agarose a 1% em TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) com uso de GelGreen (Biotium®) sob transluminador de luz azul.

A reação de seqüenciamento (Sanger *et al.* 1977) foi preparada para volume final de 7 µL com 0,35µL de primer *Cyt b* ou D-Loop; 1,05 µL de buffer BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5X para seqüenciamento e 0,7 µL BigDye® Terminator v3.1 Cycle e 1.0 µL de DNA. O mix foi colocado no termociclador para PCR de seqüenciamento incubando a 96°C por 2 min seguindo de 35 ciclos com 96°C de desnaturação por 30 s; 54°C de anelamento por 15 s e extensão a 60°C por 4 min. A leitura dos fragmentos de DNA seqüenciados foi realizada em seqüenciador automático modelo ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

Alinhamento

As sequências foram organizadas em consensus pelo programa Geneious v.4.8.5 (Drummond *et al.* 2009) (<http://www.geneious.com/>). As sequências mitocondriais do Cyt *b* e Região Controle (D-Loop) de *Epinephelus itajara* foram validadas com pesquisa de busca no GenBank para sequências similares disponível no NCBI website (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). As sequências de espécies evolutivamente similares, *Epinephelus fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* e *E. quinquefasciatus* foram adicionadas como grupos externos. Todas as sequências foram alinhadas usando programa Muscle (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/) (Edgar 2004).

Análises filogenéticas

A composição nucleotídica e análises das distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas foram estimadas pelo modelo de Kimura 2-parâmetros com 10.000 pseudo-réplicas de *bootstrap*. As sequências de haplótipos dos marcadores Cyt *b* e D-Loop foram analisados para reconstrução da árvore consenso de relacionamento genético dos haplótipos e os grupos geográficos utilizando-se o programa Mega v.5.2 (Tamura *et al.* 2011) pelo método estatístico de análise probabilística de máxima verossimilhança (MV) pelo modelo GTR (General Time Reversible), com *bootstrap* de 10.000 pseudo-réplicas (Felsenstein, 1981) e indicados os índices superiores a 50%.

As análises da taxa de saturação e o gráfico de dispersão das transições e transversões foram gerados no programa DAMBE v. 5.2.15 (Xia 2000; Xia & Xie 2001) (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>).

Análise de estruturação e diversidade

Foram definidas cinco unidades amostrais: Pará, Pernambuco/Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina. Para as análises, amostras das unidades foram agrupadas para cada localidade pelo programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009). Os grupos foram escolhidos considerando três aspectos: a localização geográfica, as características das principais correntes superficiais da costa brasileira e a geologia costeira.

A diversidade intrapopulacional foi analisada pela estimativa da diversidade genética (*h*), probabilidade de dois haplótipos diferentes serem escolhidos aleatoriamente (Nei 1987) e a diversidade nucleotídica (π), probabilidade de dois nucleotídeos homólogos diferentes serem escolhidos aleatoriamente (Tajima 1983; Nei 1987).

A diferenciação genética entre cada grupo foi testada usando o índice F_{ST} (*F-statistics*) (Wright 1951). Para obter esta diferenciação foi testado em um modelo de estrutura geográfica definida *a priori* usando uma análise de variância molecular (AMOVA) baseada na análise par a

par pelo quadrado das distâncias Euclidianas entre os haplótipos (Excoffier *et al.* 1992). As análises populacionais foram desenvolvidas usando o programa Arlequin versão 3.11, sendo a significância estatística de F_{ST} determinada por permutações não-paramétricas, considerando-se 10000 permutações (Excoffier *et al.* 2005) e usando a significância pela correção de Bonferoni.

Análise Filogeográfica

A análise filogenética de *Epinephelus itajara* da costa brasileira foi baseada nos relacionamentos genéticos dos haplótipos das sequências de Cyt *b* e D-Loop, juntamente com os grupos externos (*Epinephelus fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* e *E. quinquefasciatus*), para determinar como as populações foram relacionadas e avaliar alguma evidência de dispersão histórica e colonização entre as regiões.

Para estabelecer a relação entre os haplótipos, uma rede de haplótipos de *E. itajaradas* unidades amostrais foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Network 4.6.1.2 (www.fluxus-engineering.com) (Bandelt *et al.* 1999).

História Demográfica e Neutralidade

O histórico demográfico e as expansões espaciais das unidades populacionais foram analisados usando as distribuições mismatch dos nucleotídeos das diferenças par a par entre os haplótipos pelo programa Arlequin versão 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Este tipo de análise discrimina se uma população sofreu rápida expansão populacional (possivelmente depois de um gargalo) ou se manteve estável ao longo do tempo (Rogers e Harpending 1992). A significância do relacionamento entre o log da divergência genética e o log da distância geográfica entre as unidades populacionais foram analisados pelo Teste de Mantel pelo programa BioEstat v.5.3 (Ayres *et al.* 2007)

A distribuição unimodal (como uma curva de Poisson) ocorre se o acúmulo de novas mutações é maior do que a perda de variação através da deriva genética e a distribuição multimodal ocorre se a geração de novas mutações é compensada pela deriva genética aleatória (Rogers e Harpending 1992). O índice de Raggedness (*rg*) (Harpending 1994) e a soma dos desvios quadrados (SSD) (Schneider e Excoffier 1999) foram aplicados para determinar se alguma distribuição mismatch foi formada a partir de uma população expandida (valores pequenos) ou população estacionária (valores altos). Os parâmetros de expansão demográfica τ (escala de tempo mutacional), θ_0 e θ_1 (parâmetro de mutação antes e depois da expansão (Harpending 1994) foram obtidos pelo Arlequin 3.11. O Arlequin também foi usado para testar a hipótese de neutralidade das mutações ao longo do tempo pelos estimadores do teste *D* de Tajima e *F_s* de Fu testados com 10.000 permutações (Tajima 1989; Fu 1997).

RESULTADOS

Composição Nucleotídica (Cyt *b*)

A região Cyt *b* do DNA mitocondrial (mtDNA) foi sequenciada em 216 indivíduos (668 bp) revelando uma diversidade de nove haplótipos. Do total de pares de bases (bp) 585 foram sítios conservados, 83 sítios variáveis e cinco sítios informativos. A frequência de nucleotídeos foi de T = 0,238, C = 0,139, A = 0,320 e G = 0,303. Não foi detectado saturação na taxa de transição / transversão (ti/tv).

A distância genética de *Epinephelus itajara* entre as unidades populacionais foi de 0,1% entre as localidades da costa brasileira (Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina). A distância genética entre *E. itajara* e *E. quinquefasciatus* variou entre 6,5 a 6,6%, entre *E. itajara* e *E. lanceolatus* foi de 13,4% e entre *E. lanceolatus* e *E. quinquefasciatus* foi de 12,4% pela sequência do Cyt *b* (663 bp) do DNA mitocondrial.

O dendograma reconstruído a partir da matriz de haplótipos Cyt *b* de *E. itajara* de seis localidades da costa brasileira (Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina) para o modelo de Máxima Verossimilhança é suportado pela inclusão de duas espécies evolutivamente similares (*E. fuscoguttatus* e *E. lanceolatus*) com alto índice de *bootstrap* (100 %) (Figura 1).

Epinephelus itajara foi totalmente separado das espécies *E. lanceolatus* e *E. quinquefasciatus*, analisadas como grupo externo. Nenhum clado geográfico foi diferenciado geneticamente nos grupos populacionais pelo marcador Cyt *b* em *E. itajara* (Figura 1).

Composição Nucleotídica (D-Loop)

A região controle (D-Loop) do DNA mitocondrial (mt DNA) foi sequenciada em 216 indivíduos (771 bp) revelando uma diversidade de 44 haplótipos. Do total de pares de bases (bp) 716 foram sítios conservados, 54 sítios variáveis e 41 sítios informativos. A frequência de nucleotídeos foi de T = 0,366, C = 0,120, A = 0,340 e G = 0,174. Não foi detectado saturação na taxa de transição / transversão (ti/tv).

da matriz D-Loop mostra ainda, um haplótipo da localidade de Pernambuco (PE h40) que está suportando todos os demais haplótipos de *E. itajara* identificados nas outras localidades, indicando uma linhagem histórica provável dos outros haplótipos (Figura 1).

Epinephelus itajara foi totalmente separado das espécies *E. fuscoguttatus* e *E. lanceolatus*, analisadas como grupo externo. Nenhum clado geográfico foi diferenciado geneticamente nos grupos populacionais pelo marcador D-Loop em *E. itajara* (Figura 1).

Variabilidade Populacional

A diversidade haplotípica do Cyt *b* foi moderada, sendo observados valores entre $0,2967 \pm 0,1150$ em Pernambuco e $0,6538 \pm 0,1060$ em Sergipe. No entanto, a diversidade nucleotídica foi extremamente baixa variando entre $0,0004 \pm 0,0005$ em Pernambuco a $0,001348 \pm 0,001124$ em Sergipe (Tabela II)

A diversidade haplotípica do D-Loop foi alta, sendo observados valores entre $0,7000 \pm 0,2184$ em Santa Catarina e $0,9341 \pm 0,0448$ em Sergipe. No entanto, a diversidade nucleotídica foi baixa variando entre $0,00104 \pm 0,00103$ em Santa Catarina a $0,0068 \pm 0,0039$ em Sergipe (Tabela II).

Tabela II. Diversidades haplotípicas (*h*) e nucleotídicas (π) intrapopulacionais para *Epinephelus itajara* pelos marcadores mitocondriais Cyt *b* (Citocromo Oxidase) e D-Loop (Região Controle).

Grupos Populacionais	CYT <i>b</i>		D-LOOP	
	Diversidade Haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade Nucleotídica (π)	Diversidade Haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade Nucleotídica (π)
Bahia	$0,4668 \pm 0,0786$	$0,000737 \pm 0,000776$	$0,7282 \pm 0,0617$	$0,002870 \pm 0,001789$
Espírito Santo	$0,4018 \pm 0,0504$	$0,000646 \pm 0,000650$	$0,8898 \pm 0,0187$	$0,006315 \pm 0,003437$
Pará	$0,5333 \pm 0,1801$	$0,001135 \pm 0,001025$	$0,8222 \pm 0,0969$	$0,004711 \pm 0,002968$
Pernambuco	$0,2967 \pm 0,1150$	$0,000471 \pm 0,000555$	$0,9058 \pm 0,0380$	$0,005132 \pm 0,002968$
Santa Catarina	$0,4000 \pm 0,2373$	$0,000600 \pm 0,000762$	$0,7000 \pm 0,2184$	$0,001045 \pm 0,001039$
Sergipe	$0,6538 \pm 0,1060$	$0,001348 \pm 0,001124$	$0,9341 \pm 0,0448$	$0,006842 \pm 0,003949$

Relacionamento Filogeográfico da População

A estimativa de diferenciação genética par a par usando a estatística *F* e os valores de *p* para o Cyt *b* foi significativa apenas entre a Bahia e o Espírito Santo e entre Pará e Espírito Santo. No entanto, pela análise do D-Loop houve diferença significativa do grupo populacional do Pará com os grupos da Bahia, Pernambuco e Santa Catarina. Diferença significativa também foi observada entre o grupo populacional da Bahia e todos os outros grupos, exceto Santa Catarina (Tabela III).

Tabela III. Distâncias genéticas das unidades populacionais e valores de p (** = $p < 0,01$, pela correção de Bonferoni) para os dados do F_{ST} de *Epinephelus itajara* na costa brasileira pelos marcadores Cyt b (diagonal esquerda) e D-Loop (diagonal direita).

	Bahia	Espírito Santo	Pará	Pernambuco	Santa Catarina	Sergipe
Bahia		0,07324**	0,63283**	0,06167**	-0,04681	0,21175**
Espírito Santo	0,04885**		0,31408	-0,00144	0,01525	-0,00615
Pará	0,09655	0,13045**		0,41454**	0,60788**	0,23272
Pernambuco	0,02646	-0,00007	0,05085		-0,00344	-0,00936
Santa Catarina	-0,10627	-0,01711	0,00497	-0,01708		0,12197
Sergipe	0,03450	0,06655	0,11680	0,09741	-0,09316	

A análise de variância molecular de cinco grupos selecionados previamente (Pará, Pernambuco/Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina) para Cyt b e D-Loop indicaram baixa variância atribuída às diferenças entre as populações. Os resultados mostram que não houve estruturação geográfica entre os grupos. Com base nestes resultados e na tabela de distâncias genéticas geradas foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) com três grupos populacionais (1. Pará; 2. Bahia; 3. Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo e Santa Catarina) (Tabela IV).

Os marcadores Cyt b e D-Loop não indicaram estruturação significativa entre os agrupamentos populacionais realizados, no entanto, os valores significativos (F_{ST}) para a par das localidades observados demonstram maior frequência de diferenciação genética importante entre as unidades do Pará e da Bahia, com as demais unidades populacionais.

Tabela IV. Análise da variância molecular (AMOVA) de *Epinephelus itajara* para Cyt b e D-Loop do DNA mitocondrial, com tres grupos populacionais: 1. Pará; 2. Bahia; 3. Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo e Santa Catarina.

Marcador Molecular	Fonte de Variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	% de Variação	Índices de Fixação	Valores de p
	Entre grupos	2	1,695	0,00965	3,81	FCT = 0,03806	0,13277
Cyt b	Entre populações dentro dos grupos	3	1,051	0,00484	1,91	FSC = 0,01983	0,14257
	Dentro das populações	210	50,202	0,23906	94,29	FST = 0,05713	0,00802
	Entre grupos	2	40,663	0,38272	15,79	FCT = 0,15795	0,19356
D-Loop	Entre populações dentro dos grupos	3	7,767	0,02500	1,03	FSC = 0,01225	0,31921
	Dentro das populações	208	419,192	2,01535	83,17	FST = 0,16827	0,00000

O relacionamento entre a divergência genética e a distância genética das unidades populacionais não mostrou correlação significativa para os marcadores Cyt b ($r = 0,1857$; $p = 0,5076$) e D-Loop ($r = 0,5131$; $p = 0,0504$), indicando que a distância geográfica não foi a

principal causa das divergências genéticas entre as localidades analisadas da população de meros na costa brasileira.

Análise Filogenética

A rede de haplótipos derivada das sequências da região Cyt *b* é representada por nove haplótipos; apenas o haplótipo 1 (h1: 74,4%) esteve presente em todas as unidades populacionais. O haplótipo 4 (h4: 10,9%) apenas não ocorreu no Pará e o haplótipo 5 (h5: 10,0%) não esteve presente no Pará e Santa Catarina. O haplótipo 7 (h7: 0,9%) ocorreu apenas no Pará e Pernambuco. Os demais haplótipos foram restritos da Bahia (h2: 1,4% e h3: 0,9%), Pará (h6: 0,5% e h8: 0,5%) e Sergipe (h9: 0,5%) (Figura 1).

A rede de haplótipos derivada das sequências da Região Controle (D-Loop) é representada por 44 haplótipos, porém não houve haplótipo presente em todas as localidades. Os haplótipos mais frequentes foram o 2 (h2: 30,2%), 1 (h1: 12,5%), 12 (h12: 11,1%) e o haplótipo 9 (h9: 6,5%). Os haplótipos restritos para determinada localidade foram representados por 30 haplótipos (68,2%), sendo 18 haplótipos raros (43,2%) presentes apenas em um indivíduo. A unidade populacional do Espírito Santo apresentou o maior número de haplótipos raros (16 haplótipos), seguido da Bahia e Pará (quatro haplótipos), Pernambuco e Sergipe (três haplótipos). A unidade populacional de Santa Catarina não apresentou haplótipo exclusivo (Figura 2).

O grande número de haplótipos restritos reforça a hipótese de diferenciação que foi sugerido pelos índices significativos de estruturação (F_{ST}) par a par, entre as localidades, especialmente entre Pará, Bahia e as demais localidades.

História Demográfica e Neutralidade

Os valores do teste D de Tajima para o Cyt *b* foram negativos para todas as unidades populacionais de *Epinephelus itajara*, exceto do Espírito Santo, mas estatisticamente não significativos, indicando excesso de sítios variáveis de nucleotídeos raros comparado com o que se esperaria em um modelo de evolução neutra. Os resultados do teste F_s de Fu, baseado na distribuição dos haplótipos, mostrou valores negativos para todos os grupos exceto o Espírito Santo e Santa Catarina, indicando excesso de haplótipos raros, além do esperado para neutralidade. No entanto, a hipótese de neutralidade não pode ser rejeitada para todas as unidades ($p > 0,05$), indicando população estável no tempo; a unidade populacional de Pernambuco teve a hipótese de neutralidade significativamente rejeitada ($p < 0,05$), com valores negativos indicam excesso de mutações raras na população (Tabela V).

Os valores do teste D de Tajima pelo D-Loop foram negativos para todas as unidades populacionais de *Epinephelus itajara*, exceto do Pará, mas estatisticamente não significativos,

indicando excesso de sítios variáveis de nucleotídeos raros comparado com o que se esperaria em um modelo de evolução neutra. No entanto, a hipótese de neutralidade foi rejeitada neste teste para a unidade populacional da Bahia, o que sugere expansão populacional abrupta no passado histórico. Os resultados do teste F_s de Fu, baseado na distribuição dos haplótipos, mostrou valores negativos para todos os grupos exceto o Pará e Santa Catarina, indicando excesso de haplótipos raros, além do esperado para neutralidade. A hipótese de neutralidade não foi significativamente rejeitada para todas as unidades populacionais (Tabela V).

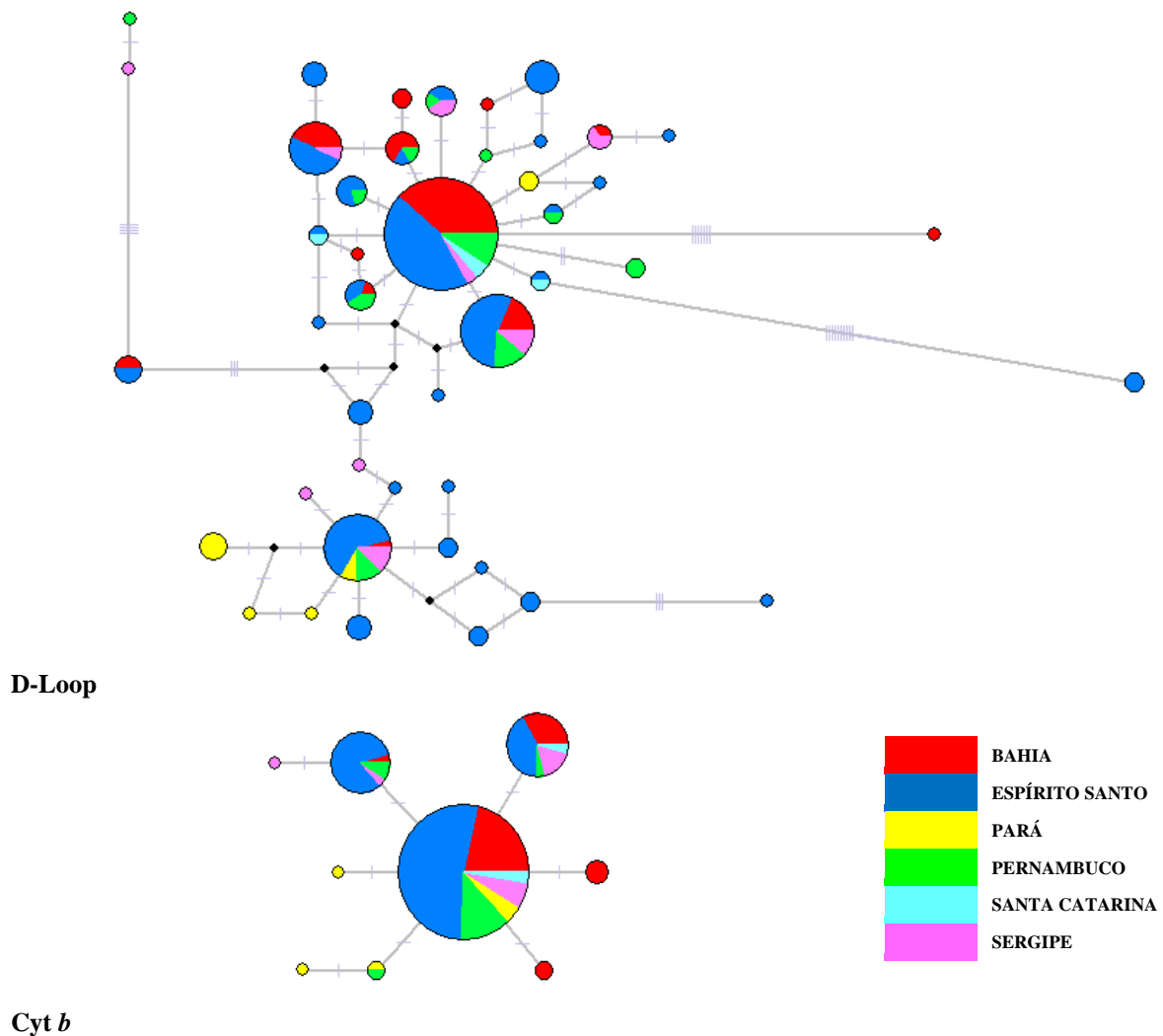


Figura 2. Rede de haplótipos das regiões D-Loop e Cyt *b* do DNA mitocondrial para as distintas unidades populacionais de *Epinephelus itajara* na costa brasileira.

As expansões demográficas históricas de *E. itajara* mostraram que a maioria das unidades populacionais apresentaram distribuição multimodal e irregular, revelando que os grupos estão em equilíbrio ou as populações estáveis. Apesar de rejeitar a hipótese de neutralidade, pelo teste D de Tajima e F_s de Fu, os parâmetros que indicam expansão da

população (Raggedness e SSD) não foram estatisticamente significativos para todas as unidades populacionais pelo Cyt *b* (Tabela V).

Os parâmetros populacionais estimados através dos índices Raggedness (*rg*) e a soma dos desvios quadrados (SSD) indicam expansão populacional pelo marcador Cyt *b* em todas as unidades populacionais. Pela região controle (D-Loop) três unidades populacionais (Espírito Santo, Pernambuco e Santa Catarina) apresentaram valores significativos, com baixos valores dos índices. Estes resultados sugerem que os dados desviam do modelo de expansão esperado. Os valores significativos de Raggedness e SSD significam que estas unidades populacionais provavelmente se mantêm em equilíbrio. A unidade populacional de Pernambuco apresentou valores significativos para os dois parâmetros, porém as outras unidades não indicam um ajuste com o modelo de expansão populacional pelos dois parâmetros de Raggedness e SSD (Tabela V).

Tabela V. *Epinephelus itajara*. Parâmetros dos modelos de expansão espacial com as significâncias ($p < 0,05^*$; Fu's Fs: $p < 0,02^*$) para cada unidade populacional. S: número de sítios polimórficos; θ_0 : tamanho populacional pré-expansão; θ_1 : tamanho populacional pós-expansão; τ : estimativa do tempo de expansão; SSD: soma dos desvios quadrados; *rg*: Índice de Raggedness.

POPULAÇÕES		Bahia	Espírito Santo	Pará	Pernambuco	Santa Catarina	Sergipe
Neutralidade							
	Tajima's <i>D</i>	-0,96558	0,21120	-1,03446	-1,50407	-0,81650	-0,22667
	Fu's <i>F_s</i>	-1,92639	0,48856	-1,46598	-2,44153**	0,09021	-0,74740
Parâmetros							
Cyt <i>b</i>	S	4	2	3	3	1	3
	θ_0	0,00000	0,00176	0,00000	0,00000	0,00527	0,00000
	θ_1	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000
	τ	1,02930	0,79492	2,32617	3,50000	1,58984	1,58594
	SSD	0,00967	0,00692	0,00152	0,00699	0,00722	0,01118
	<i>rg</i>	0,15041	0,17076	0,06667	0,24883	0,20000	0,12673
Neutralidade							
	Tajima's <i>D</i>	-1,99437**	-1,08990	0,54560	-1,24668	-0,97256	-0,12260
	Fu's <i>F_s</i>	-1,98008	-6,45029	1,47428	-2,16192	0,06069	0,72539
Parâmetros							
D-Loop	S	26	38	9	22	3	18
	θ_0	0,11953	8,36016	7,14922	0,93516	1,78418	2,40996
	θ_1	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000	99999,000
	τ	5,63477	18,11719	80,00000	3,93359	5,03711	11,75781
	SSD	0,06387	0,02293	0,11875	0,09517*	0,28163*	0,01932
	<i>rg</i>	0,16611	0,05440*	0,26370	0,17874*	1,07000	0,05146

Os parâmetros de mutação antes (θ_0) da expansão indicou um rápido crescimento populacional com grande aumento da população para todas as localidades, como pode ser sugerido pelos altos valores do parâmetro de mutação após (θ_1) a expansão nos dois marcadores mitocondriais (Cyt *b* e D-Loop).

DISCUSSÃO

Variação Genética

A variação genética analisada pela diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) pode fornecer informações que podem identificar eventos históricos das populações da espécie nas distintas localidades. Os marcadores mitocondriais (Cyt b e D-Loop) mostraram eventos populacionais distintos, porém complementares. O Cyt b apresentou baixos valores na diversidade haplotípica e extremamente baixo na diversidade nucleotídica. O D-Loop com valores da diversidade haplotípica moderada a alta e também baixa diversidade nucleotídica foram encontradas em todas as populações analisadas.

O padrão das diversidades haplotípicas e nucleotídicas encontrados pelo Cyt b sugere uma população recente ou evento fundador simples com poucas linhagens no DNA mitocondrial e já pelo D-Loop indica expansão populacional rápida e acúmulo de mutações após evento de depressão populacional por evento de gargalo ou fundador. O rápido crescimento de uma população leva à retenção de mutações novas, principalmente em sequências de DNA mitocondrial (Brown *et al.* 1979; Grant e Bowen 1998). Esta explicação é consistente com a rede de haplótipos em formato de estrela.

A linhagem basal do haplótipo de *Epinephelus itajara*, pelo marcador D-Loop, na unidade populacional de Pernambuco, pode indicar uma região de colonização histórica da espécie no Brasil. A região nordeste do Brasil poderia realmente ser uma região de colonização histórica através de ancestrais do Indo Pacífico, via Caribe, utilizando as correntes equatoriais como rotas (Contra Corrente Equatorial e Corrente Equatorial Sul) de oeste para leste, também utilizadas para dispersão de outras espécies de peixes tropicais (Muss *et al.* 2001; Joyeux *et al.* 2001; Floeter *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2008) ou mesmo via Oceano Índico, através de vórtices mais quentes da Corrente das Agulhas misturando com a fria Corrente de Benguela em períodos mais quentes do Pleistoceno (Rocha *et al.* 2005).

No geral, para os dois marcadores, muitos haplótipos foram relacionados, sendo conectados por poucos passos mutacionais (Shields e Gust 1995), embora hajam haplótipos e pequenos grupos de haplótipos distintos no D-Loop, que estão separados por várias mutações e podem indicar eventos de colonização independentes.

Os valores da diversidade genética neste estudo para o Cyt b foram similares àqueles encontrados por Craig *et al.* (2009) para *E. itajara* no Brasil, Caribe e Flórida, porém foram menores que a diversidade genética encontrada por Maggio *et al.* (2006) para *E. marginatus* no Mar Mediterrâneo. A diversidade genética no D-Loop foi similar aos valores encontrados por Silva-Oliveira *et al.* (2008), com exceção de duas localidades no norte do Brasil (Piauí e Ceará) com diversidade genética menores que este estudo. No entanto, a diversidade genética no presente estudo foi distinta aos altos valores de diversidade genética encontrados por Rivera *et*

al. (2004) para *E. quernus* no Havaí. Estes dados sugerem que *E. itajara* tende a apresentar valores menores de diversidade genética que outras espécies do gênero.

Os testes da distribuição mismatch com valores significativos do teste D de Tajima e o F_s de Fu foram indicativos de população que sofreu evento de gargalo, seguido de expansão na estrutura genética para o grupo populacional de *E. itajara* no Banco de Abrolhos na Bahia e Pernambuco. Este cenário indica um tamanho populacional pequeno e instável. No entanto, um aspecto importante para considerar é que atribuir a baixa diversidade genética a eventos históricos de gargalo ou evento fundador e expansão populacional recente, pode não considerar que alternativamente em algumas populações ameaçadas, o tamanho populacional efetivo histórico possa ter sido reduzido antes mesmo do evento demográfico fundador ou gargalo (Matocq e Villabranca 2001). No geral, a hipótese de neutralidade não foi descartada para a maioria dos grupos populacionais com uma distribuição mismatch multimodal, indicando neutralidade ou tamanho populacional em redução (Excoffier *et al.* 1992; Rogers and Harpending 1992; Rogers *et al.* 1995).

Os índices dos parâmetros demográficos (Raggedness e SSD) reforçam a expansão populacional para as unidades populacionais pelo marcador Cyt *b*. No entanto, pelo estado menos conservativo do D-Loop, os índices rg e SSD sugerem que não está ocorrendo expansão populacional em Pernambuco, assim como também não ocorre nas unidades populacionais do Espírito Santo e Santa Catarina, pelos valores significativos ($p < 0,05$) de Raggedness (rg) e a soma dos desvios quadrados (SSD), respectivamente.

As causas para baixa diversidade genética pode ser atribuída ao passado de sobreexploração (McClenachan 2009) e degradação do habitat; embora a relação de baixa diversidade com sobreexploração seja ainda restrito para algumas espécies e pouco discutido na literatura (Rodrigues *et al.* 2008). A seleção da pesca pelo tamanho dos adultos em algumas espécies pode induzir uma resposta correlacionada ao tamanho das larvas com conseqüências negativas para a sobrevivência larval, afetando a dinâmica populacional da espécie (Johnson *et al.* 2011) e a queda acentuada na relação machos e fêmeas poderia reduzir a variação de haplótipos (Portnoy *et al.* 2013). No entanto, para *Epinephelus itajara*, não está claro suficiente o nível de impacto na seletividade da pesca de indivíduos maiores e a interferência da pesca na estrutura populacional dos meros.

Estrutura Populacional

A estatística F , a AMOVA e a rede de haplótipos indicaram moderada estruturação genética nos grupos populacionais de *E. itajara* em escala interregional, indicando que o fluxo gênico ocorre ao longo da costa e há compartilhamento de haplótipos entre áreas a longas

distâncias. No entanto, para alguns grupos populacionais ainda há divergências genéticas que sugerem barreiras para dispersão larval.

Embora os testes da AMOVA não terem indicado dados significativos para estruturação dos grupos populacionais nos marcadores mitocondriais, pelo D-Loop, o Pará e principalmente a Bahia apresentaram diferenças significativas nos valores do F_{ST} indicando que estas localidades têm sido isoladas por alguma barreira de dispersão das larvas ou dos adultos. Os haplótipos compartilhados entre o Pará, Bahia e as demais localidades podem representar dispersão ocasionais entre estas localidades. Provavelmente o nível de troca genética seja abaixo do requerido para homogeneizar populações, ou haja uma barreira para o fluxo gênico entre estes grupos populacionais (Aboim *et al.* 2005).

O grau de diferenciação genética das unidades populacionais da Bahia e do Pará com as demais unidades pode ser explicado pelos eventos geológicos históricos no período Quaternário (no caso da Bahia) (Angulo *et al.* 2006) e pelos padrões de circulação das correntes oceânicas da Corrente Norte do Brasil (no caso do Pará) (Fratantoni e Richardson 2006). Já Benevides (2011), com *Cyt b*, identificou uma unidade populacional no Rio Grande do Norte sugerindo o comportamento de filopatria das fêmeas de *E. itajara*, no entanto, não identificou diferenças populacionais significativas nas unidades da Bahia e do Pará, pelo mesmo marcador mitocondrial. No estudo que desenvolvemos, estas unidades mostraram diferenças significativas pelo *Cyt b* e ainda mais marcantes com outras unidades pelo marcador D-Loop.

As áreas dos grupos populacionais de *E. itajara* estão sob influência principal da Corrente do Brasil que flui na superfície em direção sul e a Corrente Norte do Brasil que flui em direção norte. Estas correntes são originadas pela bifurcação da Corrente Sul Equatorial que flui de leste para oeste no Atlântico Sul entre as latitudes de 14.5° e 16° S (Stramma e England 1999). Considerando apenas as correntes oceânicas e as distâncias geográficas o padrão de similaridade e divergência entre os grupos populacionais seguiria tendência diferente ao observado, principalmente pela diferença significativa dos grupos populacionais mais próximos (Bahia e Espírito Santo) pelos dois marcadores (Figura 3).

A estrutura geográfica marcada entre os grupos populacionais da Bahia e o Espírito Santo (áreas muito próximas geograficamente) indicam níveis extremamente baixos de dispersão, uma vez que uma pequena quantidade de fluxo gênico seria suficiente para evitar forte diferença na frequência de alelos que causariam variações genéticas significativas observados entre as populações (Palumbi 2003). A divergência significativa do grupo populacional da Bahia, principalmente com o grupo populacional do Espírito Santo pode ser explicada pelos episódios de transgressão e regressão na zona costeira no Quaternário (Andrade *et al.* 2003), que produziram flutuações no nível do mar, especialmente nos últimos 120.000 anos (Suguio *et al.* 1985; Bittencourt *et al.* 2000). Estas oscilações provavelmente dificultaram a colonização e pode ter funcionado como barreiras de dispersão de larvas pelágicas no Banco de

Abrolhos, especialmente na plataforma interna do banco pela formação de barreiras hidrodinâmicas e geológicas eficientes (Leipe 1999) e reversão de circulação (Teixeira *et al.* 2013) que podem reter larvas na foz do Rio Caravelas, sul da Bahia. Investigações mais detalhadas da população, usando marcadores genéticos nucleares para detectar a estrutura genética nos grupos populacionais analisados neste estudo, estão sendo realizadas para avaliar a estrutura genética entre os grupos populacionais.

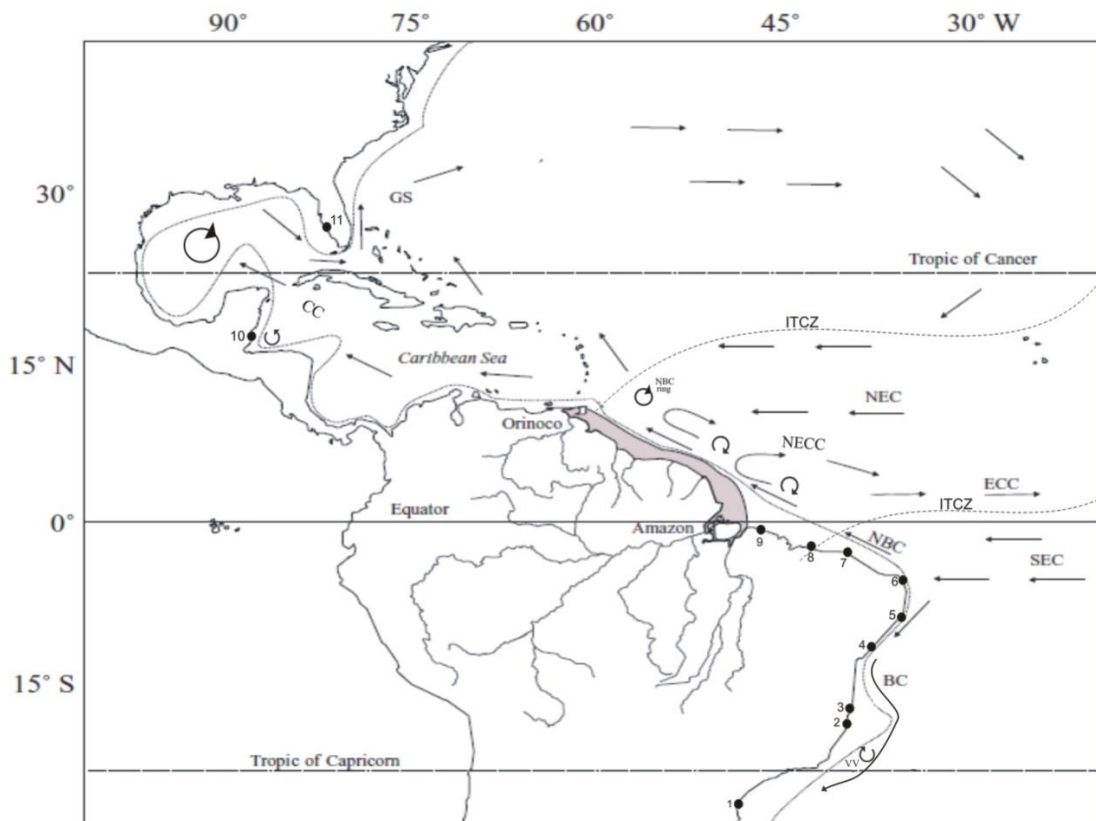


Figura 3. Circulação das principais correntes oceânicas que atuam na região costeira do Atlântico Tropical Oeste e Caribe. GS. Corrente do Golfo; NEC. Corrente Equatorial Norte; ECC. Contracorrente Equatorial; NBC. Corrente Norte do Brasil; SEC. Corrente Equatorial Sul; BC. Corrente do Brasil. Unidades populacionais: 1. Santa Catarina; 2. Espírito Santo; 3. Bahia; 4. Pernambuco; 5. Sergipe; 6. Rio Grande do Norte; 7. Ceará; 8. Piauí; 9. Pará; 10. Belize; 11. Flórida. ITCZ (----) (Área de interferência da Zona de Convergência Intertropical (Adaptado: Rocha 2003).

Os dados de divergência genética significativa entre a Bahia e o Espírito Santo podem merecer atenção especial considerando os eventos geológicos históricos associados com as características reprodutivas das espécies da subfamília Epinephelinae. Pesquisas realizadas nos últimos anos mostrando que espécies do gênero *Epinephelus*, (Sadovy *et al.* 1994; Aguilar-Perera e Aguilar-Davila 1996); *Hyporthodus* (Sedberry *et al.* 2006) e *Mycteroperca* (Coleman *et al.* 2011) formam agregações reprodutivas em áreas localizadas na margem da plataforma continental durante o verão.

Se o comportamento de agregações reprodutivas na margem da plataforma continental ocorre com *E. itajara* nos grupos populacionais da Bahia no Banco de Abrolhos, a desova desse grupo provavelmente acontece distante da costa (> 200km) e o fluxo de dispersão das larvas pelágicas devem ser direcionados para o sul pela Corrente do Brasil, contornando o banco. As áreas adjacentes ao norte do Espírito Santo podem receber um número reduzido de larvas da Bahia tendo em vista o forte fluxo da Corrente do Brasil na extremidade sudeste do banco (Soutelino *et al.* 2013) e a retenção de larvas produzido pelo Vórtice Vitória no encontro da Corrente do Brasil com a Cadeia Vitória-Trindade (Schmid *et al.* 1995). Larvas de Serranidae são encontradas abundantemente na área ao longo da margem da plataforma continental do Banco de Abrolhos com maior frequência no verão e aprisionadas no Vórtice Vitória após a passagem pelo Canal Vitória ao sul do banco (Nonaka *et al.* 2000). Estes resultados reforçam a hipótese que espécies de Serranídeos realizam agregação reprodutiva com desova na margem da plataforma do Banco de Abrolhos sincronizados no verão (Figura 3).

Desta forma, o movimento larval pode ser forçado pelas principais correntes, não ocorrendo a dispersão entre populações em fluxos de correntes distintos. Os padrões de desova e história de vida larval podem ser desenvolvidos para maximizar a retenção das larvas para área do recife de origem (Shulman e Bermingham 1995).

As divergências genéticas observadas no DNA mitocondrial de *E. itajara* em áreas adjacentes em contraposição da similaridade em áreas muito distantes podem ser consistentes com a “fragilidade” das barreiras em impedir a dispersão das larvas. Muitas espécies de peixes recifais têm alto potencial de deslocamentos a longas distâncias oceânicas durante sua fase larval. Desta forma, dispersões esporádicas podem retardar os processos de diferenciação genética que conduzem à especiação (Avice 2000), o que pode explicar a similaridade do Espírito Santo com áreas muito distantes como a Flórida. Allendorf e Phelps (1981) sugeriram que pequenas quantidades do fluxo gênico poderiam homogeneizar as populações geneticamente, mesmo amostras geográficas demograficamente descontínuas.

O grupo populacional de Santa Catarina pode não exatamente condizer com esta explicação, uma vez que o número de amostras desta localidade foi muito pequeno e pode mascarar uma divergência genética que ainda não foi detectada. Ainda assim, segundo Castro *et al.* (2007) o compartilhamento de haplótipos nos extremos limites geográficos da espécie é um resultado consistente com o potencial para migração entre bacias oceânicas que não muda independentemente do tamanho das amostras.

O estudo de filogenia de Craig *et al.* (2009) encontra estruturação genética de *E. itajara* na unidade populacional de Belize com a unidade populacional da costa brasileira. As divergências genéticas de peixes recifais da costa brasileira com o Caribe pode ser atribuída a influencia do fluxo de descarga de sedimentos e água doce na foz da bacia do Amazonas e Orinoco, funcionando como barreira biogeográfica para dispersão dos indivíduos e larvas

pelágicas das espécies recifais (Floeter e Gasparini 2000). No entanto, esta barreira não é igualmente efetiva para todas as espécies (Rocha 2003, Floeter *et al.* 2008). Craig *et al.* (2009) reconhecem a separação das populações de *E. itajara* do Caribe com o Atlântico, porém justificaram as características biológicas que demonstram a afinidade da espécie com o habitat costeiro amazônico. No estudo de Craig *et al.* (2009), a Flórida e o Brasil foram significativamente divergentes, no entanto, as amostras do Brasil foram obtidas apenas de Caravelas (Bahia) e esta localidade, como discutido, está sobre influência histórica geológica e oceanográfica do Banco de Abrolhos que pode ser uma barreira importante para dispersão larval. Análise complementar dos dados de Craig *et al.* (2009) e este estudo demonstraram similaridade genética entre unidades populacionais distantes, como Flórida e Espírito Santo, em contrapartida de divergências genéticas entre Espírito Santo e Bahia deste estudo e as unidades da Flórida e Belize no estudo de Craig *et al.* (2009).

Benevides (2011) não encontra diferenciação genética significativa com as amostras de Belize, Flórida e Bahia como foram registradas nas análises Craig *et al.* (2009) e do Pará com a Bahia neste estudo pelo marcador Cyt *b*. Estas discrepâncias nos resultados poderiam talvez sugerir que os indivíduos de cada grupo populacional possa diferir geneticamente em uma escala temporal (Pumitinee *et al.* 2009) com linhagens geneticamente distintas no tempo na mesma localidade; no entanto, a variação genética em escala temporal não foi ainda testada em *E. itajara* para confirmar esta hipótese.

O conhecimento da genética populacional de *Epinephelus itajara* baseado em análises dos marcadores mitocondriais Cyt *b* e D-Loop mostra que a espécie apresenta história de colonização recente, provavelmente associada a eventos demográficos que reduziram a população no passado. As oscilações do nível do mar no período Quaternário, especialmente ao final do Pleistoceno e início do Holoceno, podem ter sido eventos importantes para queda na diversidade genética histórica, principalmente nos ecossistemas costeiros rasos. A diversidade genética é reduzida e mantida por alta frequência de haplótipos únicos que reforçam o processo de colonização recente. Em algumas localidades, os grupos populacionais iniciaram processo de expansão populacional espacial e em outros as populações se mantiveram em equilíbrio, provavelmente em resposta aos processos ecológicos, físicos e climáticos específicos de cada localidade. Ainda assim, o padrão geral reflete uma tendência à expansão populacional pela presença comum de haplótipos raros e poucos eventos mutacionais entre os haplótipos em ambos os marcadores.

Os resultados genéticos mostraram a existência de um mosaico de heterogeneidade espacial marinha que indicam fortes barreiras às trocas demográficas. O entendimento de implicações ecológicas de estrutura genética baixa, porém significativa é difícil devido às inferências sobre fluxo gênico serem normalmente feitas em escala de tempo evolutivo e não no

período de tempo ecológico sobre a qual são tomadas as principais decisões de manejo (Palumbi 2003).

A conservação dos meros (*E. itajara*) a longo prazo dependerá dos esforços para garantir a estabilidade demográfica e os eventos de dispersão e conectividade entre as populações que mantêm a variabilidade genética da espécie. Considerando a contribuição de cada localidade para diversidade genética (alta frequência de haplótipos únicos), a conservação da espécie deve envolver um plano de gestão integrada. A legislação de proibição da pesca é uma medida importante, mas não é suficiente. Os planos de gerenciamento devem minimizar a probabilidade de mudanças na razão sexual induzidas pela pesca, assim como reduzir ou eliminar perturbações antrópicas durante as agregações de desova e assegurar que a pesca não reduza significativamente a variabilidade genética (Rowe e Hutchings 2003). Neste sentido, a proteção integral dos habitats marinhos costeiros, contemplando as áreas de estabelecimento das larvas e meros juvenis (manguezal) e áreas reprodutivas (recifes costeiros) será fundamental.

Agradecimentos

Os autores do trabalho agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), ao Projeto Meros do Brasil, patrocinado pela Petrobrás S. A. (por meio do Programa Petrobrás Ambiental) e a Transpetro Transportes S. A., pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, M.A.; MENEZES, G.M.; SCHLITT, T.; ROGERS, A.D. 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* 14:1343–1354.
- AGUILAR-PERERA, A. & AGUILAR-DAVILA, W. 1996. A spawning aggregation of Nassau grouper *Epinephelus striatus* (Pisces: Serranidae) in the Mexican Caribbean. *Environ. Biol. Fish.* 45: 351–361.
- ALJANABI S. M. & MARTINEZ I. 1997 Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Resources* 25: 4692–4693.
- ALLENDDORF, F.W.; PHELPS, S.R. 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Canadian Journal of Aquatic Science* 38:1507–1514.
- ANDRADE, A.C.S.; DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P. 2003. Quaternary evolution of the Caravelas strandplain — Southern Bahia State—Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 357–382.
- ANGULO, R.J.; LESSA, G.C.; SOUZA, M.C. 2006. A critical review of mid-to-late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. *Quaternary Science Reviews* 25: 486–506.
- ARZ, H.W.; PÄTZOLD, J.; WEFER, G. 1998. Correlated millennial-scale changes in surface hydrography and terrigenous sediment yield inferred from last-glacial marine deposits off northeastern Brazil. *Quat Res* 50: 157-166
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press, 267–276.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. 2007. *BioEstat*. Versão 5.3, Sociedade Civil Mamirauá, MCT – CNPq, Belém, Pará, Brasil.
- BANDELT, H-J; FORSTER, P.; RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.

- BEHLING, H.; ARZ, H.W.; PÄTZOLD, J.; WEFER, G. 2000. Late Quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quat Sci Rev* 19: 981-994
- BENEVIDES, E.A. 2011. Diversidade Genética, Conectividade Populacional e Conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; PERCIFOMES: EPINEPHELIDAE) na Costa Atlântica da América do Sul. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal. 92p.
- BERUMEN, M.L.; ALMANY, G.R.; PLANES, S.; JONES, G.P.; SAENZ-AGUDELO, P.; THORROLD, S.R. 2012. Persistence of self-recruitment and patterns of larval connectivity in a marine protected area network. *Ecol Evol.* 2(2): 444-452. DOI: 10.1002/ece3.208
- BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; SILVA, I.R. 2000. Patterns of sediment dispersion coastwise the State of Bahia-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 21-33.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4): 1967-1971.
- BULLOCK, L.H.; M.D MURPHY; M.F. GODCHARLES & M.E. MITCHELL 1992. Age, growth, and reproduction of jewfish *Epinephelus itajara* in the eastern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.* 90: 243-249.
- CARLIN, J.L.; ROBERTSON, D.R. & BOWEN, B.W. 2003. Ancient divergences and recent connections in two tropical Atlantic reef fishes *Epinephelus adscensionis* and *Rypticus saponaceus* (Percoidei: Serranidae). *Marine Biology* 143: 1057-1069
- CASTRO, A.L.F; STEWART, B.S.; WILSON, S.G.; HUETER, R.E.; MEEKAN, M.G.; MOTTA, P.J.; BOWEN, B.W.; KARL, S.A. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* 16: 5183-5192 DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03597.x
- CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, G.R.; KOENIG, C.C. & ELEBY, B.M. 1999. Stock Identification of Gag, *Mycteroperca microlepis*, Along the Southeast Coast of the United States. *Mar. Biotechnol.* 1: 137-146.
- COLEMAN, F.C.; SCANLON, K.M.; KOENIG, C.C. 2011. Groupers on the Edge: Shelf Edge Spawning Habitat in and Around Marine Reserves of the Northeastern Gulf of Mexico. *The Professional Geographer* 63(4): 1-19.
- COLIN, P.L. 1990. Preliminary investigations of reproductive activity of the jewfish, *Epinephelus itajara*. In. Abstr. Gulf Caribb. Fish Inst., 43rd Annu. Sess., Miami, 4-9 Nov. 1990: 9-10.
- COWEN, R.K.; SPONAUGLE, S. 2009. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1: 443-466. DOI: 10.1146/annurev.marine.010908.163757
- CRAIG, M.T.; GRAHAM, R.T.; TORRES, R.A.; HYDE, J.R.; FREITAS, M.O.; FERREIRA, B.P.; HOSTIM-SILVA, M.; GERHARDINGER, L.C.; BERTONCINI, 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. *Endang Species Res* 7:167-174.
- CRAIG, M.T. & HASTINGS, P.A. 2007. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae with a revised classification of the tribe Epinephelini. *Ichthyological Research* 54: 1-17.
- CRAIG, M.T., SADOVY DE MITCHESON, Y. J.; HEEMSTRA, P.C. 2012. Groupers of the World: A Field and Market Guide, CRC Press. 424p.
- DRUMMOND, A.J. ; B. ASHTON; M. CHEUNG; J. HELED M. KEARSE; R. MOIR; S. STONES-HAVAS; T. THIERER & A. WILSON 2009 Geneious v4. 7, Available from <http://www.geneious.com>
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792-1797 DOI: 10.1093/nar/gkh340
- EKLUND, A.M. & J. SCHULL 2001. A stepwise approach to investigate the movement patterns and habitat utilization of goliath grouper, *Epinephelus itajara*, using conventional tagging, acoustic telemetry and satellite tracking. Pages 189-216 in J. R. Sibert and J. L. Nielsen, eds. Electronic tagging and tracking in marine fisheries. Springer-Verlag, New York.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136: 479-491.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis,” *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- FAUNCE, C.H.; SERAFY, J.E. 2006. Mangroves as fish habitat: 50 years of field studies. *Marine Ecology Progress Series* 318: 1–18.
- FELSENTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution* 35: 1229-1242.
- FERREIRA, B.P.; MAIDA, M. 1995. PROJETO MERO: apresentação e resultados preliminares. *Bol. Técn. Cient. CEPENE, Tamandaré* 3 (1): 204 - 213.
- FIKSEN, O.; JORGENSEN, C.; KRISTIANSEN, T.; VIKEBO, F.; HUSE, G. 2007. Linking behavioural ecology and oceanography: larval behavior determines growth, mortality and dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347:195–205.
- FLOETER, S.R.; ROCHA, L.A.; ROBERTSON, D.R.; JOYEUX, J.C.; SMITH-VANIZ; WIRTZ, P.; EDWARDS, A.J.; BARREIROS, J.P.; FERREIRA, C.E.L.; GASPARINI, J.L.; BRITO, A.; FALCO, J.M.; BOWEN, B.W.; BERNARDI, G. 2008. Atlantic reef fish biogeography and Evolution. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 35: 22–47. DOI:10.1111/j.1365-2699.2007.01790.x
- FLOETER, S.R.; GASPARINI, J.L. 2000. The southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. *Journal of Fish Biology* 56: 1099–1114. DOI: 10.1006/jfbi.2000.1231
- FRATANTONI, D.M.; RICHARDSON, P.L. 2006. The Evolution and Demise of North Brazil Current Rings. *Journal of Physical of Oceanography* 36: 1241-1264.
- FRIAS-TORRES, S. 2006. Habitat Use of Juvenile Goliath Grouper *Epinephelus itajara* in the Florida Keys, USA. *Endangered Species Research (ESR)* 1: 1-6.
- FU, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- GERHARDINGER, L.C.; R.C. MARENZI; A.A. BERTONCINI; R.P. MEDEIROS; M. HOSTIM-SILVA 2006. Local Ecological Knowledge on the Goliath Grouper *Epinephelus itajara* (Teleostei: Serranidae) in Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 4(4):441-450.
- GOLD, J.R.; RICHARDSON, L.R. 1998. Mitochondrial DNA Diversification and Population Structure in Fisches From the Gulf of Mexico and Western Atlantic. *The Journal of Heredity* 89(5): 404-414.
- GRANT W.S.; BOWEN, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415–426.
- HARPENDING, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- HEEMSTRA, P.C. & J.E. RANDALL 1993. Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome: Food and Agriculture Organization, 16(125): 382 p.
- HUGHES, T.P.; BELLWOOD, D.R.; FOLKE, C. STENECK R.S. & WILSON, J. 2005. New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20 (7): 380-386. DOI: 10.1016/j.tree.2005.03.022
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 October 2013.
- JACKSON, J.B.C. 2001. What was natural in the coastal oceans? PNAS 98(10): 5411–5418. DOI: 10.1073ypnas.091092898
- JOHNSON, D.W.; CHRISTIE, M.R.; MOYE, J.; HIXON, M.A. 2011. Genetic correlations between adults and larvae in a marine fish: potential effects of fishery selection on population replenishment. *Evolutionary Applications* 4: 621-633. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2011.00185.x
- JOYEUX, J.C.; FLOETER, S.R.; FERREIRA, C.E.L. GASPARINI, J.L. 2001. Biogeography of tropical reef fish: the South Atlantic puzzle. *Journal of Biogeography*, 28: 831–841.
- LARA, M.R.; J. SCHULL; D.L. JONES & R. ALLMAN 2009. Early life history stages of goliath grouper *Epinephelus itajara* (Pisces: Epinephelidae) from Ten Thousand Islands, Florida. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 221-228.

- LEIPE, T.; KNOPPERS, B.; MARONE, E.; CAMARGO, R. 1999. Suspended matter transport in coral reef waters of the Abrolhos Bank, Brazil. *Geo-Marine Letters* 19(3): 186–195.
- LIBRADO, P.; ROSAS, J. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- KOENIG, C.C.; F.C. COLEMAN; A.M. EKLUND; J. SCHULL & J. UELAND 2007. Mangroves as Essential Nursery Habitat for Goliath Grouper (*Epinephelus itajara*). *Bulletin of Marine Science* 80(3): 567-586.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; KINGON, K. 2011. Pattern of recovery of the goliath grouper *Epinephelus itajara* population in the southeastern US. *Bulletin of Marine Science* 87(4):891–911. DOI: <http://dx.doi.org/10.5343/bms.2010.1056>
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. 2001. MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. *Bioinformatics*.
- MAGGIO, T; ANDALORO, F & ARCULEO, M. 2006, Genetic population structure of *Epinephelus marginatus* (Pisces, Serranidae) revealed by two molecular markers. *Italian Journal of Zoology* 73(3): 275–283.
- MANN, D.A.; LOCASCIO, J.V.; COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C. 2009. Goliath grouper *Epinephelus itajara* sound production and movement patterns on aggregation sites. *Endangered Species Research (ESR)*. 7: 229–236. DOI: 10.3354/esr00109
- MATOCQ, M.D.; VILLABLANCA, F.X. 2001. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation* 98 : 61-68.
- McCLENACHAN, L. 2009. Historical declines of goliath grouper populations in South Florida, USA. *Endangered Species Research*: 1-7. DOI: 10.3354/esr00167
- MORA, C.; SALE, P.F. 2002. Are populations of coral reef fishes open or closed? *Trends in Ecology and Evolution* 17: 422-428.
- MUSS, A.; ROBERTSON, D.R.; STEPIEN, C.A; WIRTZ, P.; BOWEN, B.W. 2001. Phylogeography of Ophioblennius: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution*,55: 561–572.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- PALUMBI, S.R. 2003. Population Genetics, Demographic Connectivity, and the Design of Marine Reserves. *Ecological Applications*, 13(1) Supplement: 146–158.
- PINA-AMARGÓS, F.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G. 2009. Movement patterns of goliath grouper *Epinephelus itajara* around southeast Cuba: implications for conservation. *Endang Species Res* Vol.7: 243–247. DOI: 10.3354/esr00192
- PORTNOY, D.S; HOLLENBECK, C.M.; RENSHAW, M. A.; CUMMINGS, N.J.; GOLD, J.R.. 2013. Does mating behaviour affect connectivity in marine fishes? Comparative population genetics of two protogynous groupers (Family Serranidae). *Molecular Ecology* 22: 301–313. DOI: 10.1111/mec.12128
- RAMÍREZ, M.A.; PATRICIA-ACEVEDO, J.; PLANAS, S.; CARLIN, J.L.; FUNK, S.M. & MCMILLAN, W.O. 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae) *Molecular Ecology Notes* 6: 813–817.
- RICHARDSON, L.R. & GOLD, J.R. 1997. Mitochondrial DNA diversity in and population structure of red grouper *Epinephelus morio*, from the Gulf of México. *Fishery Bulletin* 951: 174-179.
- RIVERA, M.A.; KELLEY, C.D.; RODERIC, G.K. 2008. Subtle population genetic structure in the Hawaiian grouper, *Epinephelus quernus* (Serranidae) as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 449–468.
- RIVERA, M.A.J.; ANDREWS, K.R.; KOBAYASHI, D.R.; WREN, J.L.K; KELLEY, C.; RODERICK, G.K.; TOONEN, R.J. 2011. Genetic Analyses and Simulations of Larval Dispersal Reveal Distinct Populations and Directional Connectivity across the Range of the Hawaiian Grouper (*Epinephelus quernus*). *Journal of Marine Biology*: 1-11. DOI:10.1155/2011/765353
- ROCHA, L.A. 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr.* 30: 1161-1171.

- ROCHA, L.A.; ROBERTSON, D.R.; ROCHA, C.R.; VAN TASSELL, J.L. CRAIG, M.T.; BOWEN, B.W. 2005. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14: 3921–3928. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02698.x
- RODRIGUES, R.; SCHNEIDER, H.; SANTOS, S.; VALLINOTO, M.; SAIN-PAULZ, 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.
- ROGERS, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49:608-615.
- ROGERS, A.R.; HAPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552–559.
- ROWE, S.; HUTCHINGS, J.A. 2003. Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18 (11): 567-572. DOI: 10.1016/j.tree.2003.09.004
- SADOVY, Y.; ROSARIO, A.; ROMAN, A. 1994. Reproduction in a aggregating grouper, the red hind *Epinephelus guttatus*. *Envir. Biol. Fish* 41: 269-286.
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C.; HUTCHISON III, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA *Nature* 265: 687 - 695 DOI:10.1038/265687a0
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G. & ADAIME, R.R. 1990. Variability of mangrove ecosystems along the brazilian coast. *Estuaries* 13(2): 201-218.
- SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*. 152: 1079–1089.
- SEDBERRY, G.R.; PASHUK, O.; WYANSKI, D.M.; STEPHEN, J.A.; WEINBACH, P. 2006. Spawning Locations for Atlantic Reef Fishes off the Southeastern U.S. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 57: 463-514.
- SEITZ, R.D., WENNHAGE, H., BERGSTRÖM, U., LIPCIUS, R.N., and YSEBAERT, T. 2013. Ecological value of coastal habitats for commercially and ecologically important species. *ICES Journal of Marine Science*. DOI:10.1093/icesjms/fst152.
- SEYOUM, S.; TRINGALI, M.D.; BARTHEL, B.L.; PUCHULUTEGUI, C.; DAVIS, M.C.; COLLINS, A.B.; CRAIG, M.T. 2013. Isolation and characterization of 29 polymorphic microsatellite markers for the endangered Atlantic goliath grouper (*Epinephelus itajara*), and the Pacific goliath grouper (*E. quinquefasciatus*). *Conservation Genet Resour*. DOI 10.1007/s12686-013-9892-x
- SHIELDS, G.F.; GUST, J.R. 1995. Lack of geographic structure in mitochondrial DNA sequences of the Bering Sea walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4: 69-82.
- SHULMAN, M.J.; BERMINGHAM, E. 1995. Early life histories, ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution* 49: 897–910.
- SILVA-OLIVEIRA, G.C.; RÊGO, P.S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. & VALLINOTO, M. 2008. Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper *Epinephelus itajara*, (Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 988-994.
- SILVA-OLIVEIRA, G.C.; A.B.C. SILVA; Y. OLIVEIRA; Z.P. NUNES; R.A. TORRES; I. SAMPAIO & M. VALLINOTO 2012. New nuclear primers for molecular studies of Epinephelidae fishes. *Conservation Genet Resour* 5: 165–168 DOI 10.1007/s12686-012-9759-6
- STEVENSON, D.E; CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, B.R. 1998. Stock Identification in Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, Using Microsatellites DNA Analysis. *Proceedings of the 50th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*: 729-747.
- STRAMMA, L.; ENGLAND, M. 1999. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res.* 104(C9): 20863–20883.
- SUGUIO, K.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; FLEXOR, J.M.; AZEVEDO, A.E.G. de 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências* 15: 273–286.

- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphisms. *Genetics* 123: 597-601.
- TAMURA, R.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2732-2739.
- TEIXEIRA, C.E.P.; LESSA, G.C.; CIRANO, M.; LENTINI, C.A.D. 2013. The inner shelf circulation on the Abrolhos Bank, 18°S, Brazil. *Continental Shelf Research* 70: 13-26.
- TORRES, R.A.; FEITOSA, R.B.; CARVALHO, D.C.; FREITAS, M.O.; HOSTIM-SILVA, M.; FERREIRA, B.P. 2013. DNA barcoding approaches for fishing authentication of exploited grouper species including the endangered and legally protected goliath grouper *Epinephelus itajara*. *Scientia Marina* 77(3): 409-418. DOI: 10.3989/scimar.03805.29A
- XIA, X. 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 276.
- XIA, X & XIE, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- WASCO, A.P.; C. MARTINS; C. OLIVEIRA & F. FORESTI 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales *Hereditas* 138: 161-165.
- WARD, R.; FIGUEROLA, M.; LUCKHURST, B.E.; BLANDON, I.V. & KAREL, W.J. 2002. Genetic Characterization of Red Hind, *Epinephelus guttatus* Collected from Three Spawning Aggregations in Western Puerto Rican Waters – Variation in Allozymes, *Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 53: 460-471.
- WAYCOTT, M.; DUARTE, C.M.; CARRUTHERS, T.J.B.; ORTH, R.J.; DENNISON, W.C.; OLYARNIK, S.; CALLADINE, A. FOURQUREAN, J.W.; HECK Jr.; HUGHES, A.R.; KENDRICK, G.A. KENWORTHY, W.J.; SHORT, F.T.; WILLIAMS, S.L. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *PNAS* 106(30): 12377-12381. DOI: 10.1073_pnas.0905620106.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- ZABEL, M.; WAGNER, T.; MENOCA, P. 2003. Terrigenous Signals in Sediments of the Low-Latitude Atlantic - Indications to Environmental Variations during the Late Quaternary: Part II: Lithogenic Matter in WEFER G (eds), 2003, *Sonderforschungsbereich 261*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O. & CHAPMAN, R.W. 2002. Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci* (Teleostei: Serranidae). *Molecular Ecology Notes* 2: 217-219.
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O.; SEDBERRY, G.R. 2004. Population genetic analysis of red grouper, *Epinephelus morio*, and scamp, *Mycteroperca phenax*, from the southeastern U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 144:769-777.

Capítulo 3: Método genético para a identificação do mero *Epinephelus itajara* e oito espécies de peixes comerciais Epinephelinae), utilizando PCR multiplex

Damasceno, J.S.¹; Siccha-Ramirez, R.²; Oliveira, C.²; Mendonça, F. F.³; Farro, A. P. C.⁴ and Hostim-Silva, M.⁴

¹ Departamento de Oceanografia e Ecologia, Base Oceanográfica, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz, ES, Brazil*

² Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

³ Departamento de Ciências do Mar, Instituto do Mar, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, Santo, SP, Brazil

⁴ Departamento de Ciências da Saúde, Agrárias e Biológicas, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil

Corresponding author: Júnio Damasceno de Souza (jdamascenobh@gmail.com)

RESUMO

Conhecida popularmente como mero, a espécie *Epinephelus itajara* encontra-se criticamente ameaçada, resultado da pesca ilegal e destruição dos habitats. Filogeneticamente relacionadas à esta espécie encontram-se garoupas que atualmente são intensamente pescadas no Atlântico Oeste e a espécie irmã *E. quinquefasciatus* do Pacífico Tropical Leste. Apesar da legislação de proibição da pesca do mero em alguns países, como Brasil e Estados Unidos, a captura ilegal com a descaracterização morfológica é uma prática comum que dificulta ou impossibilita a identificação das espécies que acabam por ser comercializadas como se fossem as espécies comuns de garoupas. A este respeito, técnicas moleculares têm fornecido ferramentas importantes para o monitoramento e fiscalização da pesca e se tornam essenciais na identificação forense de diversas espécies. No presente trabalho desenvolveu-se primers espécie-específicos, baseados no gene Citocromo c Oxidase I (COI) que aplicados em PCR-Multiplex possibilitam a identificação simultânea de nove espécies da subfamília Epinephelinae: *Epinephelus itajara*, *E. marginatus*, *E. morio*, *E. quinquefasciatus*, *Hyporthodus flavolimbatus*, *H. niveatus*, *Mycteroperca acutirostris*, *M. bonaci* e *M. microlepis*. Esta técnica poderá servir para o controle da pesca comercial e a identificação precisa do alvo de pesca visando a conservação das espécies.

Palavras chaves: Gestão Pesqueira, Conservação, PCR multiplex, Espécie Ameaçada, Genética forense

INTRODUÇÃO

A supervalorização atual da pesca tem causado a eliminação gradual e global de espécies de grande porte e de alta longevidade nos ecossistemas marinhos, levando à substituição por espécies menores de ciclos de vida curtos, organizados em cadeias tróficas simplificadas (Pauly *et al.* 2002). Dentre estas espécies de grande porte, as garoupas (Epinephelinae), com ocorrência em ecossistemas recifais de todo o mundo, possuem alto valor comercial, porém suas características biológicas de alta longevidade, maturação sexual tardia e agregação reprodutiva colocam as espécies vulneráveis à intensa pressão de pesca (Sadovy e Eklund 1999; Chiappone *et al.* 2000; Pauly *et al.* 2002; Sadovy de Mitcheson *et al.* 2012). Entre as garoupas (Epinephelinae), os peixes conhecidos pelo nome popular de Meros *Epinephelus itajara* (Lichtenstein 1822) são classificados nas listas vermelhas de espécies

ameaçadas da IUCN como uma espécie “Criticamente Ameaçada” com populações decrescentes, resultado da pressão pesqueira e a degradação do habitat (IUCN 2013).

A costa brasileira é uma importante (Hotspot) área geográfica sob o ponto de vista da conservação de peixes recifais da subfamília Epinephelinae, incluindo espécies como *Epinephelus itajara* (Criticamente Ameaçada), *E. marginatus* (Lowe 1834) (Ameaçada), *Hyporthodus flavolimbatus* (Poey, 1865) e *H. niveatus* (Valenciennes, 1828) (Vulneráveis), *E. morio* (Valenciennes, 1828) e *Mycteroperca bonaci* (Poey, 1865) (Quase Ameaçada). Espécies com status menos preocupantes também merecem atenção como *M. microlepis* (Goode & Bean, 1879) que apresenta população em declínio e *M. acutirostris* (Valenciennes, 1828) que é importante espécie alvo propensa à sobrepesca (Begossi *et al.* 2012a; 2012b; Sadovy de Mitcheson *et al.* 2012; IUCN 2013). Principalmente as espécies *E. itajara*, *E. morio*, *H. flavolimbatus*, *H. niveatus* e *M. microlepis* têm sofrido sérias ameaças como resultado da sobrepesca, em praticamente toda a costa oeste tropical e subtropical do Atlântico (Coleman 2000; Graham *et al.* 2009; Coleman & Koenig 2010; Sadovy de Mitcheson *et al.* 2012).

No Brasil, as bases de dados geradas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) e o MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura) apresentam limitações para o registro das espécies comerciais da subfamília Epinephelinae por não discriminar todas as espécies dos gêneros *Epinephelus* e *Mycteroperca*. Mesmo com a proibição da pesca em 2002, sua captura e comércio vêm sendo frequentemente registrados com médias superiores a 330 toneladas por ano entre os anos de 2003 e 2011. Tais registros tem sido suficientes para demonstrar uma relevante preocupação a respeito do estado de conservação dos meros (*E. itajara*) e do cumprimento das leis de proteção ambiental em vigência no Brasil, o acabou desencadeado várias iniciativas voltadas a pesquisa e a proteção dos meros no país (Hostim-Silva *et al.* 2005).

O direcionamento das questões de regulação da pesca depende diretamente da identificação das espécies capturadas e seus subprodutos. Identificações incorretas de espécies comercializadas têm despertado crescente preocupação para órgãos que apoiam a pesca sustentável, uma vez que falsas identificações, ainda que de espécies legalmente capturadas, reduzem a credibilidade do sistema responsável por combater a pesca e o comércio ilegal de espécies protegidas (Ogden 2008). Assim, o desenvolvimento de ferramentas práticas para a diferenciação dos recursos pesqueiros ao seu menor nível taxonômico assume um papel fundamental nas estatísticas de pesca, desenvolvimento de planos de manejo, fiscalização e preservação de espécies sobre-exploradas e já ameaçadas (Baker 2008; Ogden 2008; Alacs *et al.* 2010).

Ferramentas genéticas de identificação molecular têm sido desenvolvidas nos últimos anos paragrupos taxonômicos distintos da ictiofauna (Ward *et al.* 2005; De-Franco *et al.* 2010, 2012; Hashimoto *et al.* 2009, 2011; Mendonça *et al.* 2009; Dalton & Kotze 2011; Rodrigues *et*

al. 2011; Ulrich *et al.* 2013). A técnica de PCR-Multiplex, principalmente utilizando o gene COI (De-Franco *et al.* 2010; Mendonça *et al.* 2009) e outros genes mitocondriais e nucleares (Shivji *et al.* 2002; Chapman *et al.* 2003; Trotta *et al.* 2005; Hashimoto *et al.* 2009; Ravago-Gotanco 2010; Rodrigues *et al.* 2011) tem se mostrado eficiente como uma ferramenta de baixo custo, fácil aplicabilidade e boa capacidade de identificação de espécies, permitindo melhorar aspectos de manejo e conservação das espécies exploradas pela pesca (Abercrombie *et al.* 2005).

Dentre os marcadores moleculares de baixa complexidade, os primers de reconhecimento espécie-específicos podem gerar fragmentos de DNA com variações únicas para as espécies alvo, podendo ser detectadas em PCR seguida de corrida eletroforética simples. Assim, a metodologia de PCR-Multiplex associada às características evolutivas do gene COI tem sido reconhecida como um método rápido, seguro e de baixo custo para auxiliar no desenvolvimento de estatísticas de pesca com dados por espécies, nas ações de fiscalização das capturas mesmo sendo de itens já processados para o comércio e no desenvolvimento de ações conservacionista ao nível global (Mendonça *et al.* 2009). Recentemente Torres *et al.* (2013) utilizando a técnica de PCR-RFLP identificaram com sucesso exemplares de *E. itajara*, *E. marginatus*, *E. morio* e *M. bonaci*.

Tendo em vista os aspectos relacionados à conservação destas espécies, associados às dificuldades nas identificações por meios morfológicos, principalmente quando estes peixes são apresentados ao comércio já filetados, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método de identificação baseado nas características genéticas do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I, utilizando a PCR-multiplex, que permite a distinção simultânea entre nove espécies de meros, garoupas e badejos dos gêneros *Epinephelus*, *Mycteroperca* e *Hyporthodus*.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de Epinephelinae coletadas são pertencentes a três gêneros e nove espécies; *Epinephelus*: *E. itajara* (N = 8), *E. marginatus* (N = 6); *E. morio* (N = 2) e *E. quinquefasciatus* (N = 5); *Hyporthodus*: *H. flavolimbatus* (N = 1) e *H. niveatus* (N = 6) e *Mycteroperca*: *M. acutirostris* (N = 2), *M. bonaci* (N = 4) e *M. microlepis* (N = 1). As identificações morfológicas foram realizadas segundo Craig *et al.* (2012).

Os espécimes foram obtidos em mercados de peixes de diversas localidades da costa brasileira, tendo sido capturados por embarcações que operaram na costa de Santa Catarina, Espírito Santo, Sul da Bahia e Paraíba. As amostras de *E. quinquefasciatus* foram obtidas em peixarias da Nicarágua em Puerto Sandino. Amostras de *Epinephelus itajara* foram obtidas em Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina, utilizando artefatos de pesca tradicional (covo e cerco de pesca) com a retirada de fragmentos da nadadeira caudal por

método não letal. Após a obtenção das amostras de tecido os exemplares de *E. itajara* foram pesados, medidos, marcados e soltos na mesma área de captura. Tais procedimentos foram realizados de acordo com as licenças emitidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO/ICMBIO/MMA N^o: 25088-7 – Código de autenticação: 11928433 e N^o: 15080-2 – Código de autenticação: 84636263. Todas as amostras foram conservadas em etanol 95% e armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Vertebrados Aquáticos e no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES/UFES.

Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando a metodologia descrita por Aljanabi e Martinez (1997). Reações de amplificação do gene Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) foram efetuadas em ciclador térmico de PCR utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima Taq Polymerase (Invitrogen) e 100 ng de primers, utilizando os primers universais F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAGAAT CA -3', descritos por Ward *et al.* (2005). Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 96°C por 30 segundos, hibridação a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com 35 repetições. Os segmentos do DNA foram visualizados em gel de agarose em TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) com uso de GelRed (Biotium®) sob transluminador de luz ultravioleta. A reação de PCR para sequenciamento foi preparada para volume final de 7 µL, com 0,35µL de primer COI (F1 e R1), 1,05 µL de buffer BigDye® Terminator, 0,7 µL BigDye® Terminator v3.1 Cycle e 1,0 µL de DNA. Em ciclador térmica para PCR as amostras foram incubadas a 96°C por 2 min seguindo de 35 ciclos com 96°C de desnaturação por 30 s; 54°C de anelamento por 15 s e extensão a 60°C por 4 min. As amostras foram precipitadas para limpeza do PCR de sequenciamento com EDTA (125mM), acetato de sódio (3M) e etanol (100%); lavadas com etanol 70%, os recipientes secos a 95°C por 8 minutos e guardadas envolvido por papel alumínio e seqüenciado pelo ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

PCR-Multiplex

A partir da composição nucleotídica do gene COI foram identificados os sítios polimórficos existentes entre as espécies, quais características eram exclusivas de cada uma delas e então, desenhados os primers de reconhecimento espécie-específicos (Tabela 1) que foram utilizados em combinação com os primers F1 e R1 (Ward *et al.* 2005). Todas as reações de amplificação dos fragmentos do gene COI com os primers espécie-específicos foram realizadas utilizando ciclador térmico de PCR em 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP,

1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima Taq DNA polymerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima Taq Polymerase (Invitrogen) e 0,5mM de cada primer. Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, com 35 repetições. Os segmentos do DNA foram visualizados em gel de agarose em TAE 1X com GelRed (Biotium®).

Tabela1. Primers espécie-específicos desenvolvidos, tamanho dos fragmentos gerados e número de acesso das sequências no GenBank para nove espécies da subfamília Epinephelinae.

Espécie	Código	Fragmento (bp)	Primer	GenBank
<i>E. quinquefasciatus</i>	Eqi-COI	649	5'- TAT TTG GTG CCT GGG CTG GA -3'	KF836472
<i>E. morio</i>	Emo-COI	544	5'- TAA TTG TTA CAG CGC ATG CA -3'	KF836470
<i>E. itajara</i>	Eit-COI	483	5'- GGC TTT GGA AAT TGA CTT G -3'	KF836456
<i>H. flavolimbatus</i>	Hfl-COI	346	5'- CTG GTA CTG GCT GAA CAG TT -3'	KF836477
<i>M. microlepis</i>	Mmi-COI	292	5'- GGG CAT CTG TAG ACT TAA CC -3'	KF836490
<i>M. bonaci</i>	Mbo-COI	238	5'- CTA GGG GCA ATT AAC TTC -3'	KF836486
<i>E. marginatus</i>	Ema-COI	151	5'- CCG TAC TAA TTA CCG CAG TC -3'	KF836464
<i>H. niveatus</i>	Hng-COI	100	5'- CGC CGG TAT TAC AAT GCT ATT G -3'	KF836478
<i>M. acutirostris</i>	Mac-COI	55	5'- TCT TTG ATC CAG CAG GAG GC -3'	KF836484

Análises

As sequências foram alinhadas pelo software BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall 1999) e o consenso entre elas foi gerado pelo programa Geneious v. 4.8.5 (Drummond *et al.* 2009). Os táxons da matriz foram analisados para construção de dendrogramas de similaridade genética empregando o programa Mega v. 5.2 (Tamura *et al.* 2011) pelos métodos de Neighbour-joining (NJ) utilizando o modelo de Tamura-Nei para cálculo de substituição de nucleotídeos e o método de análise probabilística de máxima verossimilhança (ML) com o modelo GTR (General Time Reversible). Os dendrogramas foram testados utilizando o método de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicações (Felsenstein, 1981) e indicados os índices superiores a 50%. A composição nucleotídica e análises das distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas foram estimadas pelo modelo de Kimura-2-parâmetros com 1000 replicações de *bootstrap*. As análises da taxa de saturação e o gráfico de dispersão das transições e transversões foram gerados no programa DAMBE v. 5.2.15 (Xia 2000; Xia & Xie 2001) (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>). O valor do R² foi determinado pelo programa Excel 2007 (Microsoft for Windows).

RESULTADOS

A amplificação do gene COI gerou fragmentos com 655bp para todas as espécies estudadas, sendo a composição nucleotídica de 31% Timina (T), 27,1% Citosina (C), 24,1% Adenina (A) e 17,8% Guanina (G). Entre as nove espécies foram encontrados 171 sítios

variáveis, sendo 165 informativos para as análises comparadas. Os valores do coeficiente de determinação para transições e transversões foram respectivamente $R^2 = 0,975$ e $R^2 = 0,802$.

A identificação das espécies *E. itajara*, *E. marginatus*, *E. morio*, *M. acutirostris*, *M. bonaci* e *M. microlepis* utilizando as sequências do gene COI foram confirmadas no banco de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As espécies *E. quinquefasciatus*, *H. flavolimbatus* e *H. niveatus* ainda não apresentavam sequências de referência para o gene COI no GenBank.

Os dendogramas construídos a partir da matriz do COI foram similares para os métodos de Neighbor-joining e Maximum Likelihood e apresentaram nove grupos específicos que foram suportados por altos índices de *bootstrap* (100%) distinguindo cada uma das espécies. De forma mais inclusiva pode-se destacar três grandes grupos formados por *M. bonaci*, *M. microlepis*, *M. acutirostris* e *E. marginatus* no primeiro agrupamento; *H. flavolimbatus* e *H. niveatus* no segundo grupo e *E. morio*, *E. quinquefasciatus* e *E. itajara* no terceiro agrupamento (Figura 1).

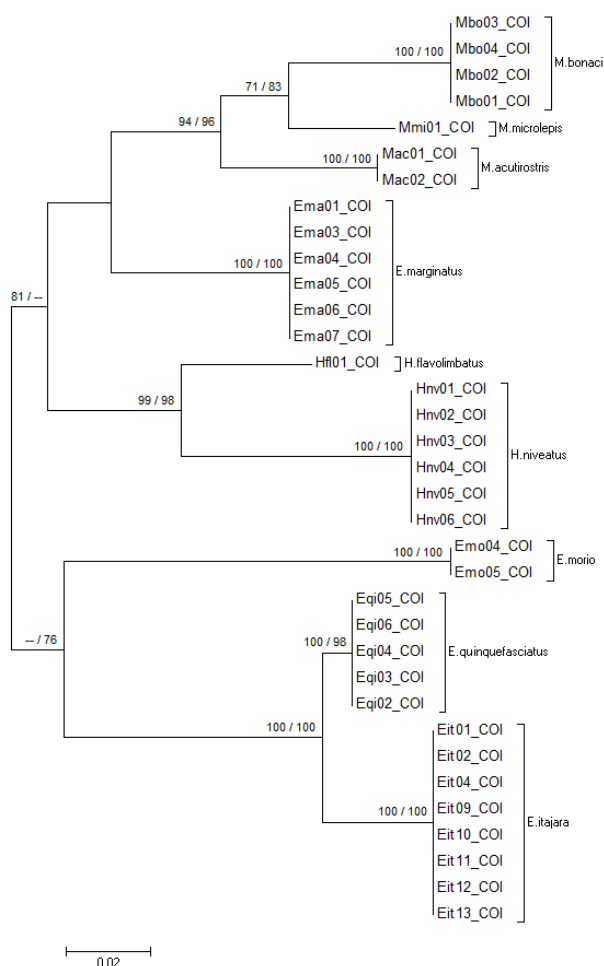


Figura 1. Dendrograma das espécies de peixes comerciais da subfamília Epinephelinae. Valores à esquerda (NJ)/ direita (ML). As espécies foram separadas com altos índices de suporte e três cladogramas foram separados: 1) *Mycteroperca bonaci*, *M. microlepis*, *M. acutirostris* e *Epinephelus marginatus*; 2) *Hyporthodus flavolimbatus* e *H. niveatus*; 3) *E. morio*, *E. quinquefasciatus* e *E. itajara*.

A maior e menor distância genética interespecíficas foram observadas entre *Epinephelus morio* e *Hyporthodus niveatus* com 17,9% e entre *E. itajara* e *E. quinquefasciatus* com 3,3% respectivamente. Em geral as espécies congêneres apresentaram divergência genética inferiores a 11%. No entanto, entre as espécies *E. itajara* e *E. morio* a divergência genética foi de 15,8%, entre *E. itajara* e *E. marginatus* foi de 13,3%, entre *E. morio* e *E. quinquefasciatus* a divergência genética observada foi de 12,8% (Tabela 2). Dentre as amostras analisadas não foram encontradas diferenças genéticas intraespecíficas.

Tabela 2. Índices de divergência genética (diagonal inferior) e desvio padrão (diagonal superior) para nove espécies da subfamília Epinephelinae pelo modelo de Kimura-2-parâmetros e 1000 replicações de *bootstrap*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>E. itajara</i>	*	0,015	0,018	0,007	0,017	0,017	0,017	0,016	0,017
2	<i>E. marginatus</i>	0,133	*	0,015	0,015	0,013	0,014	0,013	0,013	0,014
3	<i>E. morio</i>	0,158	0,132	*	0,017	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017
4	<i>E. quinquefasciatus</i>	0,033	0,128	0,151	*	0,016	0,017	0,016	0,015	0,016
5	<i>H. flavolimbatus</i>	0,146	0,101	0,166	0,135	*	0,012	0,013	0,014	0,013
6	<i>H. niveatus</i>	0,159	0,112	0,179	0,151	0,084	*	0,016	0,015	0,016
7	<i>M. acutirostris</i>	0,139	0,101	0,153	0,128	0,108	0,138	*	0,012	0,011
8	<i>M. bonaci</i>	0,140	0,105	0,159	0,133	0,117	0,127	0,087	*	0,010
9	<i>M. microlepis</i>	0,150	0,100	0,143	0,136	0,106	0,133	0,071	0,065	*

Com base nas divergências genéticas detectadas entre as espécies foi possível selecionar as regiões do gene COI com maior probabilidade de especificidade de anelamento dos novos primers. Assim, o conjunto de primers elaborado possibilitou a amplificação de fragmentos do DNA mitocondrial com tamanhos, em pares de bases, diferentes para cada uma das espécies de Epinephelinae, utilizando em PCR-multiplex os primers espécie-específicos (forward) e os primers universais forward e reverse em uma mesma reação. O tamanho dos fragmentos produzidos para cada uma das nove espécies é apresentado na Tabela 1.

Os primers espécie-específicos foram inicialmente testados com seu conjunto de amostras específicas para avaliar sua eficácia em PCR comum. Em seguida, foram testados com os diferentes grupos de amostras contendo todas as demais espécies para identificar potenciais amplificações incorretas. Em todos os testes obteve-se os resultados esperados com amplificações de fragmentos de tamanhos distintos para cada conjunto de primers, sem a presença de falsos positivos (Figura 2).

Os primers espécie-específicos foram inicialmente testados com seu conjunto de amostras específicas para avaliar sua eficácia em PCR comum. Em seguida, foram testados com os diferentes grupos de amostras contendo todas as demais espécies para identificar

potenciais ampliações incorretas. Em todos os testes obteve-se os resultados esperados com ampliações de fragmentos de tamanhos distintos para cada conjunto de primers, sem a presença de falsos positivos (Figura 2).

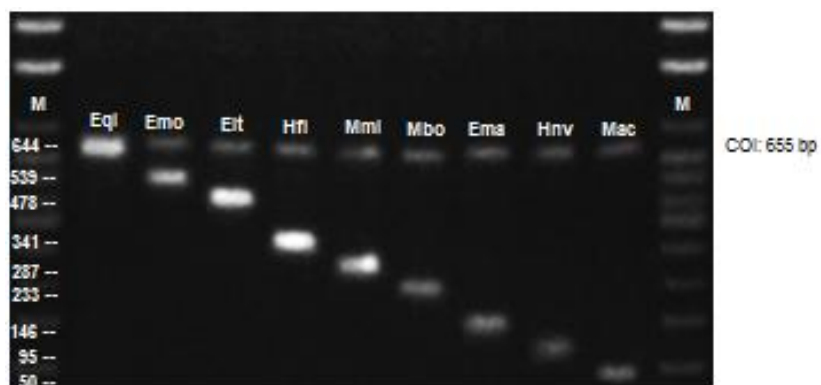


Figura 2. Resultado da eletroforese em gel em agarose com nove bandas de fragmentos das espécies de garoupas da subfamília Epinephelinae e a banda do COI universal com 655 bp. Eql. *Epinephelus quinquefasciatus* (644bp), Emo. *E. morio* (539 bp), Eit. *E. itajara* (478 bp), Hfl. *Hyporthodus flavolimbatus* (341 bp), Mmi. *Mycteroperca microlepis* (287 bp), Mbo. *M. bonaci* (233 bp), Ema. *E. marginatus* (146 bp), Hnv. *H. niveatus* (95 bp) e Mac. *M. acutirostris* (50 bp). M. Marcador de peso molecular. (Eletroforese: Agarose 1%, 100V, 100mA, 90minutos).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram uma ausência de diferenciação genética dentro das espécies para as quais foram analisados mais de um indivíduo. A forte sobrepesca que tem atravessado estas espécies e a destruição de seus habitats (Dulvy *et al.* 2003; Giménez-Hurtado *et al.* 2005; McClenachan 2009; Begossi *et al.* 2012; Sadovy de Mitcheson *et al.* 2012) poderia explicar a ausência das distâncias intraespecíficas dentro das nove espécies analisadas, levando a um gargalo de garrafa genético devido a endogamia entre os indivíduos observado nesta baixa distância intraespecífica. O gargalo genético já havia sido sugerido por Gold e Richardson (1998) para *Epinephelus morio* no Golfo do México e por Maggio *et al.* (2006) para *E. marginatus* no Mediterrâneo, provavelmente em decorrência da sobrepesca. Já Koenig *et al.* (2007) sugerem o mesmo efeito de gargalo de garrafa genético pela restrição de habitats de manguezal de qualidade para juvenis de *E. itajara*.

Por outro lado, uma alta distância interespecífica foi encontrada dentro do gênero *Epinephelus* com um valor médio de 12,25%, quando comparado com 8,4% e 7,4% pertencentes aos gêneros *Hyporthodus* e *Mycteroperca* respectivamente. A menor divergência genética entre *E. itajara* e *E. quinquefasciatus* era esperada pela proximidade filogenética descrita por Craig *et al.* (2009) separando as populações de *E. itajara* do Pacífico (*E. quinquefasciatus*) e do Atlântico (*E. itajara*). Estas espécies eram consideradas uma única espécie por não apresentarem características morfológicas distintas para separação dessas

populações (Heemstra & Handall 1993). No presente estudo encontrou-se para o gene COI um índice de divergência similar ao gene 16S ($\pm 3\%$) e menor que Cyt b ($\pm 6\%$) encontrados no estudo de Craig *et al.* (2009).

O sinal filogenético do gene COI não é suficiente para identificar com exatidão as relações taxonômicas de *Epinephelus*, *Hyporthodus* e *Mycteroperca*; no entanto, a formação dos clados específicos e gêneros foram similares às relações filogenéticas descritas por Craig e Hastings (2007) para a filogenia molecular do grupo Epinephelinae, reforçando a hipótese de que *E. marginatus* seja classificada como *Mycteroperca marginata*.

Nos experimentos de PCR-Multiplex os primers desenvolvidos foram eficientes na caracterização de distintos padrões de amplificação com tamanhos distintos de bandas após corrida eletroforética para as nove espécies de garoupas (Epinephelinae) com aplicação simultânea, possibilitando considerável economia de tempo e esforço laboratorial. No Brasil os meros (*Epinephelus itajara*) estão sob proteção legal, sendo sua captura, transporte e comercialização proibidos desde 2002. No entanto, a pesca eventual e seu comércio vem ocorrendo. Como descrito por De-Franco *et al.* (2012) em um estudo sobre a pesca ilegal da raia-viola (*Rhinobatos horkelii*), os pescadores têm conhecimento a respeito da lei de proibição da pesca de diversas espécies, mas a ineficiência dos órgãos governamentais nas medidas de fiscalização e controle provavelmente incentivam a pesca ilegal. Especificamente para a espécie *E. itajara* o desenvolvimento de um marcador de identificação genética é uma valiosa ferramenta para fiscalização da pesca e na formulação de base segura e confiável de aplicação da legislação contra a pesca, captura e o comércio da espécie.

Os resultados de diagnóstico e validação dos primers espécie-específicos das espécies da subfamília Epinephelinae foram eficazes e poderão servir como ferramentas de uso prático para identificação das garoupas analisadas principalmente as espécies ameaçadas, como a garoupa (*E. marginatus*) ou em risco de extinção, como o mero (*E. itajara*). Coleman e Koenig (2010) destacam que *E. morio* é uma das espécies mais comuns no Golfo do México e sujeita a sobrepesca e o gênero *Hyporthodus* merece atenção devido à mudança para prática de pesca em profundidade ameaçando espécies como *H. flavolimbatus*, *H. nigritus* e *H. niveatus*. A participação conjunta da comunidade, órgãos públicos e pesquisadores é importante na proteção de espécies ameaçadas (Salas *et al.* 2007), bem como, a aplicação de tecnologias, como ferramentas moleculares na contribuição da identificação de pontos-chaves para direcionar as metas de conservação (Alacs *et al.* 2010). A genética molecular, com o desenvolvimento de primers espécie-específicos de espécies comerciais tem fornecido ferramentas de uso prático e de baixo custo que podem auxiliar na identificação precisa para mecanismos de manejo sistemático adequado.

Agradecimentos

Os autores do trabalho agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), ao Projeto Meros do Brasil, patrocinado pela Petrobrás S. A. (por meio do Programa Petrobrás Ambiental) e a Transpetro Transportes S. A., pelo apoio financeiro. Agradecimento especial ao Dr. Vander C. Tosta, Dr. Leonardo F. Machado (Universidade Federal do Espírito Santo) pelos direcionamentos relevantes da proposta de trabalho e enriquecimento nos dados deste estudo e Isabela M. Cheida por ter cedido amostras de *Epinephelus quinquefasciatus* analisados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie DL, Clark SC, Shivji MS (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics* 6:775–788. DOI 10.1007/s10592-005-9036-2.
- Alacs EA, Georges A, Fitzsimmons NN, Robertson J (2011) DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife Forensics. *Forensic Sci Med Pathol.* 6:180–194. DOI 10.1007/s12024-009-9131-7
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Resources* 25: 4692–4693.
- Ardura A, Pola IG, Linde AR, Garcia-Vazquez E. (2010) DNA-based methods for species authentication of Amazonian commercial fish. *Food Research International* 43: 2295–2302. DOI:10.1016/j.foodres.2010.08.004
- Begossi A, Salivonchyk SV, Barreto T, Nora V, Silvano RAM (2012a) Small-scale Fisheries and Conservation of Dusky Grouper (Garoupa), *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in the Southeastern Brazilian Coast. *Science Journal of Agricultural Research and Management*. Volume 2012, Article ID sjarm-174, 4 Pages, 2012. DOI: 10.7237/sjarm/174
- Begossi A, Lopes PFM, Silvano R. (2012b) Co-Management of Reef Fisheries of the Snapper-Grouper Complex in a Human Ecological Context in Brazil. In: G. H. Kruse, H. I. Browman, K. L. Cochrane, D. Evans, G. S. Jamieson, P. A. Livingston, D. Woodby and C. I. Zhang. (Org.). *Global Progress in Ecosystem-Based Fisheries Management*. 1ed. Fairbanks: Alaska Sea Grant, 2012 (1): 353-373.
- Chapman DD, Abercrombie DL, Douady CJ, Pikitch EK, Stanhopen MJ, Shivji MS (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 4: 415-425.
- Chiappone M, Sluka R, Sealey KS (2000) Groupers (Pisces: Serranidae) in fished and protected areas of the Florida Keys, Bahamas and northern Caribbean. *Marine Ecology Progress Series* 198: 261–272.
- Coleman FC, Koenig CC, Huntsman GR, Musick JA, Eklund AM, McGoven JC, Chapman RW, Sedberry GR, Grimes CB (2000) Long-lived Reef Fishes: The Grouper-Snapper Complex. *Fisheries* 25 (3): 14-20.
- Coleman FC, Koenig CC (2010) The Effects of Fishing, Climate Change, and Other Anthropogenic Disturbances on Red Grouper and Other Reef Fishes in the Gulf of Mexico. *Integrative and Comparative Biology* 50 (2): 201–212. DOI:10.1093/icb/icq072
- Craig MT, Sadovy De Mitcheson YJ, Heemstra PC (2012). *Groupers of the World: A Field and Market Guide*, CRC Press. 424p.
- Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS (2007) Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1–6. DOI:10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- De-Franco BA, Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F (2009) Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelii*, *R. percellens* and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. *Molecular Ecology Resources* 10: 197–199. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02728.x
- De-Franco BA, Mendonça FF, Oliveira C, Foresti F (2012) Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: genetic identification to aid conservation. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*. DOI: 10.1002/aqc.2229
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse J, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A (2009) Geneious v4. 7, Available from <http://www.geneious.com>

- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution* 35: 1229-1242.
- Graham RT, Rhodes KL, Castellanos D. (2009) Characterization of the goliath grouper *Epinephelus itajara* fishery of southern Belize for conservation planning. *Endang Species Res.* 7: 195–204. DOI: 10.3354/esr00187
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2009) Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR–RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* 298: 346–349. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.11.015
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2011) Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture* 321: 49–53. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.018
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270: 313–322. DOI:10.1098/rspb.2002.2218
- Heemstra PC, Randall JE (1993) Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome: Food and Agriculture Organization, 16(125): 382 p.
- Hostim-Silva, M.; Andrade, AB.; Gerhardinger, LC; Machado, LF 2005. The Lord of the Rock s conservation program in Brazil: the need for a new perception of marine fishes. *Coral Reefs*, 24: 74.
- IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013. 1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 October 2013.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, De-Franco BA, Porto-Foresti F, Gadig BF, Oliveira C, Foresti F (2009) Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. *Conservation Genetics Resources* 2: 31–35. DOI 10.1007/s12686-009-9131-7
- Morris AV, Roberts CM, Hawkins JP (2000) The threatened status of groupers (Epinephelinae). *Biodiversity and Conservation* 9: 919–942.
- Ogden R. (2008) Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* 9: 462–472.
- Pauly D, Christensen V, Sylvie G, Pitcher TJ, Sumaila UR, Walters CJ, Watson R, Zeller D. (2002) Towards sustainability in world fisheries. *Nature* 418: 689-695.
- Ravago-Gotanco RG, Manglicmot MT, Pante MJR (2010) Multiplex PCR and RFLP approaches for identification of rabbitfish (*Siganus*) species using mitochondrial gene regions. *Molecular Ecology Resources* 10: 741–743. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02829.x
- Rodrigues KF, Shigeharu S, Ch'Ng CL (2011) Microsatellite Markers for the Identification of Commercially Important Groupers *Epinephelus lanceolatus*, *Cromileptes altivelis* and *Epinephelus fuscoguttatus* *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34 (2): 311 -315.
- Sadovy Y, Eklund AM (1999) Synopsis of biological information on the Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, (Bloch 1792), and the jewfish, *E. itajara* (Lichtenstein 1822). NOAA Technical Report, NMFS 146, and FAO Fisheries Synopsis 157. 65 p.
- Sadovy De Mitcheson Y, Craig MT, Bertonecini AA, Carpenter KE, Cheung WWL, Choat JH, Cornish AS, Fennessy ST, Ferreira BP, Heemstra PC, Liu M, Myers RF, Pollard DA, Rhodes KL, Rocha LA, Russell BC, Samoilys MA, Sanciangco J. (2012) Fishing groupers towards extinction: a global assessment of threats and extinction risks in a billion dollar fishery. *Fish and Fisheries*: 1-18. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2011.00455.x
- Shivji M, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohler N, Stanhope M (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology* 16: 1036-1047.
- Tamura R, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2732-2739.
- Trotta M, Schönhuth S, Pepe T, Cortesi ML, Puyet A, Bautista JM (2005) Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2039-2045. DOI: 10.1021/jf048542d
- Ulrich RM, John DE, Barton GW, Hendrick GS, Fries DP, Paul JH (2013) Ensuring seafood identity: Grouper identification by real-time nucleic acid sequence-based amplification (RT-NASBA). *Food Control* 31: 337-344. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.012
- Xia, X. (2000) Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 276.

- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 360: 1847–1857. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716
- Wasko AP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2003) Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161–165.

CONCLUSÕES GERAIS

A importância dos habitats de manguezal para os meros juvenis e conseqüentemente, para conservação da espécie, fica evidente nos principais estudos realizados nos ecossistemas costeiros. Os meros juvenis são frequentemente encontrados nos manguezais em todo seu limite de distribuição tropical no Atlântico oeste, tendo como principal ameaça a degradação e perda dos manguezais pela ocupação humana.

Os estudos de *Epinephelus itajara* juvenis realizados são raros, especialmente em áreas tropicais. Muitos aspectos biológicos e ecológicos da espécie ainda são desconhecidos, no entanto, a análise conjunta dos dados, enfatizou a relação dos habitats de manguezal para os ciclos de vida inicial dos meros e indicou uma forte associação do manguezal com as funções vitais dos meros nos primeiros estágios de vida.

A alta abundância de meros juvenis, com média inferior a outros estuários, pode ser um indicativo de habitat com baixa qualidade de sobrevivência ou alta influência da pesca predatória.

Este estudo também forneceu indícios importantes para medidas de proteção integral e recuperação de ambientes costeiros (recifes costeiros e manguezais), controle eficaz da pesca e pesquisas de longo prazo para identificar habitats relevantes que possam servir de berçários e reprodução dos meros.

O padrão genético de meros na costa brasileira pelas diversidades haplotípicas e nucleotídicas, por marcadores mitocondriais (Cyt *b* e D-Loop), sugere que a população é recente e em expansão.

O padrão genético das diversidades haplotípicas e nucleotídicas encontrados pelo Cyt *b* sugere uma população recente ou evento fundador simples com poucas linhagens no DNA mitocondrial e já pelo D-Loop indica expansão populacional rápida e acúmulo de mutações após evento de depressão populacional por evento de gargalo ou fundador. O conhecimento da genética populacional de *Epinephelus itajara* baseado em análises dos marcadores mitocondriais Cyt *b* e D-Loop mostra que a espécie apresenta história de colonização recente, provavelmente associada a eventos demográficos que reduziram a população no passado. As oscilações do nível do mar no período Quaternário, especialmente ao final do Pleistoceno e início do Holoceno, podem ter sido eventos importantes para queda na diversidade genética histórica, principalmente nos ecossistemas costeiros rasos. A diversidade genética é reduzida e mantida por alta frequência de haplótipos únicos que reforçam o processo de colonização recente. Em algumas localidades, os grupos populacionais iniciaram processo de expansão populacional espacial e em outros as populações se mantiveram em equilíbrio, provavelmente em resposta aos processos ecológicos, físicos e climáticos específicos de cada localidade. Ainda assim, o padrão geral reflete uma tendência à expansão populacional pela presença comum de haplótipos raros e poucos eventos mutacionais entre os haplótipos em ambos os marcadores. Os

resultados genéticos mostraram a existência de um mosaico de heterogeneidade espacial marinha que indicam fortes barreiras às trocas demográficas.

Os resultados do presente estudo enfatizam a necessidade de medidas de controle e proteção dos habitats e da espécie. Neste sentido, o diagnóstico e validação dos primers espécie-específicos das espécies da subfamília Epinephelinae foram eficazes e poderão servir como ferramentas de uso prático para identificação das garoupas analisadas principalmente as espécies ameaçadas, como a garoupa (*E. marginatus*) ou em risco de extinção, como o mero (*E. itajara*). A genética molecular, com o desenvolvimento de primers espécie-específicos de espécies comerciais tem fornecido ferramentas de uso prático e de baixo custo que podem auxiliar na identificação precisa para mecanismos de manejo sistemático adequado.

Estes primers poderão ser técnicas de uso imediato pelo poder público na fiscalização da pesca ilegal de meros na costa brasileira como medida para inibir ainda mais a captura de exemplares pela pesca esportiva e de pequena escala, apesar da proibição da pesca em toda costa brasileira.

A conservação dos meros (*E. itajara*), a longo prazo, dependerá dos esforços para garantir a estabilidade demográfica e os eventos de dispersão e conectividade entre as populações que mantêm a variabilidade genética da espécie. Considerando a contribuição de cada localidade para diversidade genética (alta frequência de haplótipos únicos), a conservação da espécie deve envolver um plano de gestão integrada. A legislação de proibição da pesca é uma medida importante, mas não é suficiente. Neste sentido, a proteção integral dos habitats marinhos costeiros, contemplando o estabelecimento das larvas e meros juvenis (manguezal) e áreas reprodutivas (recifes costeiros) será fundamental. Portanto, A conservação de *Epinephelus itajara* em todo seu limite de distribuição depende de ações conjuntas, interdisciplinares, com envolvimento de vários setores da sociedade e acordos firmados que ultrapassam as fronteiras políticas nos ambientes costeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, M.A.; MENEZES, G.M.; SCHLITT, T.; ROGERS, A.D. 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* 14:1343–1354.
- AGUILERA, O.; AGUILERA, D.R. 2004. Goliath Grouper (Pisces: Serranidae) from the Upper Miocene Urumaco Formation, Venezuela. *J. Paleont.*, 78(6): 1202–1206.
- ABERCROMBIE, D.L.; CLARK, S.C.; SHIVJI, M.S. 2005. Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics* 6:775–788. DOI 10. 1007/s10592-005-9036-2.
- AGUILAR-PERERA, A.; AGUILAR-DAVILA, W. 1996. A spawning aggregation of Nassau grouper *Epinephelus striatus* (Pisces: Serranidae) in the Mexican Caribbean. *Environ. Biol. Fish.* 45: 351–361.
- AGUILAR-PERERA, A.; APPELDONRN, R.S. 2008. Spatial distribution of marine fishes along a cross-shelf gradient containing a continuum of mangrove-seagrass-coral reefs off southwestern Puerto Rico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 378-394. DOI: 10.1016/j.ecss.2007.07.016
- AGUILAR-PERERA, A.; SCHÄRER, M. & NEMETH, M. 2006. Occurrence of Juvenile Nassau Grouper, *Epinephelus striatus* (Teleostei: Serranidae), off Mona Island, Puerto Rico: Considerations of Recruitment Potential. *Caribbean Journal of Science* 42(2): 264-267.
- ALACS, E. A.; GEORGES, A.; FITZSIMMONS, N.N.; ROBERTSON, J. 2011. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife. *Forensics. Forensic Sci Med Pathol.* 6:180–194. DOI 10. 1007/s12024-009-9131-7
- ALBAÑEZ-LUCERO, M.O.; ARREGUÍN-SÁNCHEZ, F. 2009. Modelling the spatial distribution of red grouper (*Epinephelus morio*) at Campeche Bank, México, with respect substrate. *Ecological Modelling* 220: 2744–2750. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2009.07.007
- ALJANABI S. M. & MARTINEZ I. 1997 Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Resources* 25: 4692–4693.
- ALLENDORF, F.W.; PHELPS, S.R. 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Canadian Journal of Aquatic Science* 38:1507–1514.
- ALVES, J.A. ; PINHEIRO, P.C. 2011. Peixes recifais das ilhas costeiras do Balneário Barra do Sul – Santa Catarina – Brasil. *Revista CEPsul - Biodiversidade e Conservação Marinha* 2 (1): 10-21.
- ANDRADE, A.C.S.; DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P. 2003. Quaternary evolution of the Caravelas strandplain — Southern Bahia State—Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 357–382.
- ANGULO, R.J.; LESSA, G.C.;SOUZA, M.C. 2006. A critical review of mid-to-late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. *Quaternary Science Reviews* 25: 486–506.
- ARAÚJO, J.N. & MARTINS A.S. 2009. Aspects of the population biology of *Cephalopholis fulva* from the central coast of Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 25: 328–334. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2008.01181.x
- ARDURA, A.; POLA, I.G.; LINDE A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 2010. DNA-based methods for species authentication of Amazonian commercial fish. *Food Research International* 43: 2295–2302. DOI:10. 1016/j.foodres. 2010. 08. 004
- ARZ, H.W.; PÄTZOLD, J.; WEFER, G. 1998. Correlated millennial-scale changes in surface hydrography and terrigenous sediment yield inferred from last-glacial marine deposits off northeastern Brazil. *Quat Res* 50: 157-166

- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press, 267–276.
- BANDEL, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37–48.
- BARLETTA, M.; COSTA, M. F. 2009. Living and nonliving resources exploitation in a tropical semi-arid estuary. *Journal of Coastal Research SI* 56: 371–375.
- BARLETTA, M.; BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U. 1998. Description of the fishery structure in the mangrove dominated region of Bragança (State of Pará – North Brazil). *Ecotropica* 4: 41–53.
- BARLETTA, M.; BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U.; HUBOLDT, G. 2003. Seasonal changes in density, biomass, and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (Northern Brazilian coast, East Amazon). *Marine Ecology Progress Series* 256: 217–228.
- BASILIO, T.H.; GODINHO, W.O.; ARAÚJO, M.E.; FURTADO-NETO, M.A.A.; FARIA, V.V. 2009. ICTIOFAUNA DO ESTUÁRIO DO RIO CURU, CEARÁ, BRASIL. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza* 42(2): 81 – 88.
- BECK, M.W.; HECK Jr., K.L.; ABLE, K.W.; CHILDERS, D.L.; EGGLESTON, D.B.; GILLANDERS, B.M.; HALPERN, B.; HAYS, C.G.; HOSHINO, K.; MINELLO, T.J.; ORTH, R.J.; SHERIDAN, P.F.; WEINSTEIN, M.P. 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51: 633–641.
- BEETS, J.; HIXON M.A. 1994. Distribution, Persistence and Growth of Groupers (Pisces: Serranidae) on Artificial and Natural Patch Reefs in the Virgin Islands. *Bulletin of Marine Science*. 55(2-3): 470-483.
- BEGOSSI, A.; SALIVONCHYK, S.V.; BARRETO, T.; NORA, V.; SILVANO, R.A.M. 2012a. Small-scale Fisheries and Conservation of Dusky Grouper (*Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in the Southeastern Brazilian Coast. *Science Journal of Agricultural Research and Management*. Volume 2012, Article ID sjarm-174, 4 Pages, 2012. DOI: 10.7237/sjarm/174
- BEGOSSI, A.; LOPES, P.F.M.; SILVANO, R. 2012b. Co-Management of Reef Fisheries of the Snapper-Grouper Complex in a Human Ecological Context in Brazil. In: G.H. Kruse, H.I. Browman, K.L. Cochrane, D. Evans, G.S. Jamieson, P.A. Livingston, D. Woodby and C.I. Zhang. (Org.). *Global Progress in Ecosystem-Based Fisheries Management*. 1ed. Fairbanks: Alaska Sea Grant, 2012 (1): 353-373.
- BEHLING, H.; ARZ, H.W.; PÄTZOLD, J.; WEFER, G. 2000. Late Quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quat Sci Rev* 19: 981-994
- BENEVIDES, E.A. 2011. Diversidade Genética, Conectividade Populacional e Conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; PERCIFORMES: EPINEPHELIDAE) na Costa Atlântica da América do Sul. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal. 92p.
- BERUMEN, M.L.; ALMANY, G.R.; PLANES, S.; JONES, G.P.; SAENZ-AGUDELO, P.; THORROLD, S.R. 2012. Persistence of self-recruitment and patterns of larval connectivity in a marine protected area network. *Ecol Evol*. 2(2): 444-452. DOI: 10.1002/ece3.208
- BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; SILVA, I.R. 2000. Patterns of sediment dispersion coastwise the State of Bahia-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 21–33.
- BLABER, S.J.M. 2000. *Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation & conservation*. Blackwell, Oxford. 372p.
- BOTERO, J.; OSPINA, J.F. 2003. Crecimiento y Desempeño General de Juveniles Silvestres de Mero Guasa *Epinephelus itajara* (Lichtenstein) Mantenidos em Jaulas Flotantes Bajo Diferentes Condiciones de Cultivo. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 32: 25-36.

- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4): 1967–1971.
- BRUSCHER, J.H.; SCHULL, J. 2009. Non-lethal age determination for juvenile goliath grouper (*Epinephelus itajara*) from southwest Florida. *Endangered Species Res.* 7: 205–212. DOI: 10.3354/esr00126
- BULLOCK, L.H.; M.D MURPHY; M.F. GODCHARLES & M.E. MITCHELL 1992. Age, growth, and reproduction of jewfish *Epinephelus itajara* in the eastern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.* 90: 243-249.
- CARLIN, J.L.; ROBERTSON, D.R.; BOWEN, B.W. 2003. Ancient divergences and recent connections in two tropical Atlantic reef fishes *Epinephelus adscensionis* and *Rypticus saponaceus* (Percoidei: Serranidae). *Marine Biology* 143: 1057–1069
- CASS-CALAY, S.L.; SCHMIDT, T.W. 2008. Monitoring changes in the catch rates and abundance of juvenile goliath grouper using the ENP creel survey, 1973–2006. *Endangered Species Research*: 1-11. DOI: 10.3354/esr00139
- CASTRO, A.C.L. 2001. Diversidade da assembléia de peixes em igarapés do estuário do Rio Paciência (MA – Brasil). *Revista Atlântica* 23: 39–46.
- CASTRO, A.L.F; STEWART, B.S.; WILSON, S.G.; HUETER, R.E.; MEEKAN, M.G.; MOTTA, P.J.; BOWEN, B.W.; KARL, S.A. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* 16: 5183–5192 DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03597.x
- CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, G.R.; KOENIG, C.C.; ELEBY, B.M. 1999. Stock Identification of Gag, *Mycteroperca microlepis*, Along the Southeast Coast of the United States. *Mar. Biotechnol.* 1: 137–146.
- CHAPMAN, D.D.; ABERCROMBIE, D.L.; DOUADY, C. J.; PIKITCH, E.K.; STANHOPEN, M.J.; SHIVJI, M.S. 2003. A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 4: 415-425.
- CHAVES, L.C.T.; NUNES, J.A.C.C.; SAMPAIO, C.L.S. 2010. Shallow Reef Fish Communities of South Bahia Coast, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58(special issue IICBBM): 33-46.
- CHIAPPONE, M.; SLUKA, R.; SEALEY, K.S. 2000. Groupers (Pisces: Serranidae) in fished and protected areas of the Florida Keys, Bahamas and northern Caribbean. *Marine Ecology Progress Series* 198: 261–272.
- COATES, A.G.; JACKSON, J.B.C.; COLLINS, L.S.; CRONIN, T.M.; DOWSETT, H.T.; BYBELL, L.M.; JUNG, P.; OBANDO, J. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin* 104: 814–828.
- COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C.; HUNTSMAN, G.R.; MUSICK, J.A.; EKLUND, A M.; McGOVEN, J.C.; CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, G.R.; GRIMES, CB. 2000. Long-lived Reef Fishes: The Grouper-Snapper Complex. *Fisheries* 25 (3): 14-20.
- COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C.; SCANLON, K.M.; HEPPELL, S.; HEPPELL, S.; MILLER, M.W. 2010. Benthic Habitat Modification through Excavation by Red Grouper, *Epinephelus morio*, in the Northeastern Gulf of Mexico. *The Open Fish Science Journal* 3:1-15.
- COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C. 2010. The Effects of Fishing, Climate Change, and Other Anthropogenic Disturbances on Red Grouper and Other Reef Fishes in the Gulf of Mexico. *Integrative and Comparative Biology* 50 (2): 201–212. DOI:10.1093/icb/icq072
- COLEMAN, F.C.; SCANLON, K.M.; KOENIG, C.C. 2011. Groupers on the Edge: Shelf Edge Spawning Habitat in and Around Marine Reserves of the Northeastern Gulf of Mexico. *The Professional Geographer* 63(4): 1–19.
- COLIN, P.L. 1990. Preliminary investigations of reproductive activity of the jewfish, *Epinephelus itajara*. In. Abstr. Gulf Caribb. Fish Inst., 43rd Annu. Sess., Miami, 4-9 Nov. 1990: 9-10.

- COLIN, P.L.; SADOVY, Y.J.; DOMEIER, M.L. 2003. Manual for the Study and Conservation of Reef Fish Spawning Aggregations. Special Publication. Society for the Conservation of Reef Fish Aggregations No. 1 (Version 1.0). (www.SCRFA.org).
- CONDINI, M.V.; GARCIA, A. M.; VIEIRA, J.P. 2007. Perfil do pescador e descrição da pesca da garoupa (Pisces, Serranidae) no Molhe Oeste da Barra de Rio Grande, RS. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2(3): 279-287.
- COWEN, R.K.; SPONAUGLE, S. 2009. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1: 443–466. DOI: 10.1146/annurev.marine.010908.163757
- CRAIG, M.T.; GRAHAM, R.T.; TORRES, R.A.; HYDE, J.R.; FREITAS, M.O.; FERREIRA, B.P.; HOSTIM-SILVA, M.; GERHARDINGER, L.C.; BERTONCINI, 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 (ESR)* 7:167-174.
- CRAIG, M.T.; HASTINGS, P.A. 2007. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae with a revised classification of the tribe Epinephelini. *Ichthyological Research* 54: 1–17.
- CRAIG, M.T., SADOVY DE MITCHESON, Y. J.; HEEMSTRA, P.C. 2012. *Groupers of the World: A Field and Market Guide*, CRC Press. 424p.
- CUNHA, F.E.A.; MONTEIRO-NETO, C.; NOTTINGHAM, M.C. 2007. Temporal and spatial variations in tidepool fish assemblages of the northeast coast of Brazil. *Biota Neotropica* 7(1).
- DAHLGREN, C.P.; KELLISON, G.T.; ADAMS, A.J.; GILLANDERS, B.M.; KENDALL, M.S.; LAYMAN, C.A.; LEY, J.A.; NAGELKERKEN, I.; SERAFY, J.E. 2006. Marine nurseries and effective juvenile habitats: concepts and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312: 291–295.
- DAROS, F.A.; BUENO, L.S.; VILAR, C.C.; PASSOS, A.C.; SPACH, H.L. 2012. Checklist of rocky reef fishes from the Currais Archipelago and Itacolomis Island, Paraná state, Brazil. *Check List* 8(3): 349-354.
- DAWNAY, N.; OGDEN, R.; McEWING, R.; CARVALHO, G.R.; THORPE, R.S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1–6. DOI:10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- DE-FRANCO, B.A.; MENDONÇA, F.F.; HASHIMOTO, D.T.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2009. Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelii*, *R. percellens* and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. *Molecular Ecology Resources* 10: 197–199. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02728.x
- DE-FRANCO, B.A.; MENDONÇA, F.F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2012. Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: genetic identification to aid conservation. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* DOI: 10.1002/aqc.2229
- DRUMMOND, A.J. ; B. ASHTON; M. CHEUNG; J. HELED M. KEARSE; R. MOIR; S. STONES-HAVAS; T. THIERER & A. WILSON 2009 Geneious v4. 7, Available from <http://www.geneious.com>
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792–1797 DOI: [10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340)
- EGGLESTON, D.B. 1995. Recruitment in Nassau grouper *Epinephelus striatus*: post-settlement abundance, microhabitat features, and ontogenetic habitat shifts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124:9-22.
- EKLUND, A.M. 2005. *Habitats Affinities of Juvenile Goliath Grouper to Assess Estuarine Conditions*. In: Bortone S.A. (ed) *Estuarine Indicators*. CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap.25 p. 393-407.

- EKLUND, A.M.; SCHULL, J. 2001. A stepwise approach to investigate the movement patterns and habitat utilization of goliath grouper, *Epinephelus itajara*, using conventional tagging, acoustic telemetry and satellite tracking. Pages 189–216 in J. R. Sibert and J. L. Nielsen, eds. *Electronic tagging and tracking in marine fisheries*. Springer-Verlag, New York.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136: 479-491.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis,” *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- FARMER, N.A.; KARNAUSKAS, M. 2013. Spatial Distribution and Conservation of Speckled Hind and Warsaw Grouper in the Atlantic Ocean off the Southeastern U.S.. *PLoS ONE* 8(11): e78682. DOI:10.1371/journal.pone.0078682
- FAUNCE, C.H.; SERAFY, J.E. 2006. Mangroves as fish habitat: 50 years of field studies. *Marine Ecology Progress Series* 318: 1–18.
- FELSENTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution* 35: 1229-1242.
- FERREIRA, B.P.; HOSTIM-SILVA, M.; GERHARDINGER, L.C.; ANDRADE, A.B. 2006. Investigación y conservación de Meros en Brasil: Grupo de Especialistas en Meros y Lábridos (GWSG) de la UICN. Boletín Especies Amenazadas América del Sur UICN.
- FERREIRA, B.P.; MAIDA, M. 1995. PROJETO MERO: apresentação e resultados preliminares. *Bol. Técn. Cient. CEPENE, Tamandaré* 3 (1): 204 - 213.
- FERREIRA, C.E.L.; GONÇALVES, J.E.A.; COUTINHO, R. 2001. Community structure of fish and habitat complexity on a tropical rocky shore. *Environmental Biology of Fishes* 61: 353-369.
- FIKSEN, O.; JORGENSEN, C.; KRISTIANSEN, T.; VIKÉBO, F.; HUSE, G. 2007. Linking behavioural ecology and oceanography: larval behavior determines growth, mortality and dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347:195–205.
- FLOETER, S.R.; GASPARINI, J.L. 2000. The southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. *Journal of Fish Biology* 56: 1099–1114. DOI: 10.1006/jfbi.2000.1231
- 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.
- FLOETER, S.R.; ROCHA, L.A.; ROBERTSON, D.R.; JOYEUX, J.C.; SMITH-VANIZ; WIRTZ, P.; EDWARDS, A.J.; BARREIROS, J.P.; FERREIRA, C.E.L.; GASPARINI, J.L.; BRITO, A.; FALCO, J.M.; BOWEN, B.W.; BERNARDI, G. 2008. Atlantic reef fish biogeography and Evolution. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 35: 22–47. DOI:10.1111/j.1365-2699.2007.01790.x
- FRATANTONI, D.M.; RICHARDSON, P.L. 2006. The Evolution and Demise of North Brazil Current Rings. *Journal of Physical of Oceanography* 36: 1241-1264.
- FRIAS-TORRES, S. 2006. Habitat Use of Juvenile Goliath Grouper *Epinephelus itajara* in the Florida Keys, USA. *Endangered Species Research (ESR)* 1: 1-6.
- FRIAS-TORRES, S.; BARROSO, P.; EKLUND, A.M.; SCHULL, J.; SERAFY, J.E. 2007. Activity Patterns of Three Juvenile Goliath Grouper, *Epinephelus itajara*, in a Mangrove Nursery. *Bulletin of Marine Science* 80(3): 587-594.
- FRIAS-TORRES, S.; LUO, J. 2008. Using dual-frequency sonar to detect juvenile goliath grouper *Epinephelus itajara* in mangrove habitat. *Endangered Species Research (ESR)* 1: 1-6. DOI: 10.3354/esr00138

- FU, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- GALINDO, H.; OLSON, D.; PALUMBI, S. 2006. Seascape genetics: A coupled oceanographic-genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Current Biology*, 16: 1622–1626. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.052
- GERHARDINGER, L.C.; MARENZI, R.C.; BERTONCINI, A.A.; MEDEIROS, R.P.; HOSTIM-SILVA, M. 2006. Local Ecological Knowledge on the Goliath Grouper *Epinephelus itajara* (Teleostei: Serranidae) in Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 4(4):441-450.
- GIBRAN, F.Z. 2007. Activity, habitat use, feeding behavior, and diet of four sympatric species of Serranidae (Actinopterygii: Perciformes) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 5(3): 387-398.
- GIGLIO, V.J.; FREITAS, M.O. 2013. Caracterização da pesca artesanal com rede de camboa na Reserva Extrativista de Cassurubá, Bahia. *Biotemas* 26 (2): 249-259. DOI: 10.5007/2175-7925.2013v26n2p249
- GOLD, J.R.; RICHARDSON, L.R. 1998. Mitochondrial DNA Diversification and Population Structure in Fishes From the Gulf of Mexico and Western Atlantic. *The Journal of Heredity* 89(5): 404-414.
- GRAHAM, R.T.; RHODES, K.L.; CASTELLANOS, D. 2009. Characterization of the goliath grouper *Epinephelus itajara* fishery of southern Belize for conservation planning. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 195–204. DOI: 10.3354/esr00187
- GRANT W.S.; BOWEN, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415–426.
- GRAY, J.S. 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* 6: 153-175.
- HACKRADT, C.W.; FÉLIX-HACKRADT, F.C. 2009. Assembléia de peixes associados a ambientes consolidados no litoral do Paraná, Brasil: uma análise qualitativa com notas sobre sua bioecologia. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49(31): 389-403.
- HACKRADT, C.W.; FÉLIX-HACKRADT, F.C.; GARCIA-CHARTON, J.A. 2011. Influence of habitat structure on fish assemblage of an artificial reef in southern Brazil. *Marine Environmental Research* 72: 235-247. DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.09.006
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HARMELIN, J.; HARMELIN-VIVIEN, M. 1999. A review on habitat, diet and growth of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Marine Life* 9(2): 11-20.
- HARPENDING, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- HASHIMOTO, D.T.; FMENDONÇA, F.F.; SENHORINI, J.A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. 2009 Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR–RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* 298: 346–349. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.11.015
- HASHIMOTO, D.T.; FMENDONÇA, F.F.; SENHORINI, J.A.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. 2011. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture* 321: 49–53. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.018

- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; WAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270: 313–322. DOI:10.1098/rspb.2002.2218
- HEEMSTRA, P.C.; RANDALL, J.E. 1993. Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome: Food and Agriculture Organization, 16(125): 382 p.
- HELLBERG, M.E.; BURTON, R.S.; NEIGEL, J.E.; PALUMBI, S.R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci* .70: 273–90.
- HIXON, M.A.; CARR, M.H. 1997. Synergistic predation, density dependence, and population regulation in marine fish. *Science* 277: 946–949.
- HONORIO, P.P.F.; RAMOS, R.T.C. 2010. Fishes of Sapatas Reef Northeastern Brazil. *Revista Nordestina de Biologia* 19(2): 25-34.
- HOSTIM-SILVA, M.; LIMA, A.C.; SPACH, H.L.; PASSOS, A.C.; SOUZA, J.D. 2013. Estuarine demersal fish assemblage from a transition region between the tropics and the subtropics of the South Atlantic. *Biotemas* 26 (3): 153-161. DOI: 10.5007/2175-7925.2013v26n3p153
- HUGHES, T.P.; BELLWOOD, D.R.; FOLKE, C. STENECK R.S. & WILSON, J. 2005. New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20 (7): 380-386. DOI: 10.1016/j.tree.2005.03.022
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 October 2013.
- JACKSON, J.B.C. 2001. What was natural in the coastal oceans? PNAS 98(10): 5411–5418. DOI: 10.1073/pnas.091092898
- JOHNSON, D.W.; CHRISTIE, M.R.; MOYE, J.; HIXON, M.A. 2011. Genetic correlations between adults and larvae in a marine fish: potential effects of fishery selection on population replenishment. *Evolutionary Applications* 4: 621-633. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2011.00185.x
- JONES, R.S.; GUTHERZ, E.J.; NELSON, W.R.; MATLOCK, G.C. 1989. Burrow utilization by yellowedge grouper, *Epinephelus flavolimbatus*, in the northwestern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 26: 277-284.
- JOYEUX, J.C.; FLOETER, S.R.; FERREIRA, C.E.L. GASPARINI, J.L. 2001. Biogeography of tropical reef fish: the South Atlantic puzzle. *Journal of Biogeography*, 28: 831–841.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C. 1998. Absolute abundance and survival of juvenile gags in sea grass beds of the northeastern Gulf of Mexico. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 44–55.
- KOENIG, C.C.; COLIN, P.L. 1999. Absolute abundance and survival of juvenile Gag, *Mycteroperca microlepis* (Pisces: Serranidae) in seagrass beds on the Northeastern Gulf of México. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 45: 37-54.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; GRIMES, C.B.; FITZHUGH, G.R.; SCANLON, K.M.; GLEDHILL, C.T.; GRACE, M. 2000. Protection of fish spawning habitat for the conservation of warm-temperate reef-fish fisheries of shelf-edge reefs of Florida. *Bull. Mar. Sci.*66: 593–616.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; EKLUND, A.M.; SCHULL, J.; UELAND, J. 2007. Mangroves as Essential Nursery Habitat for Goliath Grouper (*Epinephelus itajara*). *Bulletin of Marine Science* 80(3): 567-586.
- KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; KINGON, K. 2011. Pattern of recovery of the goliath grouper *Epinephelus itajara* population in the southeastern US. *Bulletin of Marine Science* 87(4):891–911. DOI: <http://dx.doi.org/10.5343/bms.2010.1056>

- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. 2001. MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. *Bioinformatics*.
- LARA, M.R.; SCHULL, J.; JONES D.L.; ALLMAN, R. 2009. Early life history stages of goliath grouper *Epinephelus itajara* (Pisces: Epinephelidae) from Ten Thousand Islands, Florida. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 221-228.
- LA MESA, G.; LOUISY, P. & VACCHI, M. 2002. Assessment of microhabitat preferences in juvenile dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) by visual sampling. *Mar. Biol., Berlin* 140: 175-185. DOI: 10.1007/s002270100682
- LACERDA, L.D. (Ed.) 1993. *Conservation and sustainable utilization of mangrove forests in Latin America and Africa regions*. v.2. Mangrove Ecosystems Technical Reports, Okinawa: ITTO/ISME, Japan, p.245-272.
- LAEGDSGAARD, P.; JOHNSON, C.R. 2001. Why do juvenile fish utilize mangrove habitats? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257: 229–253.
- LARA, M.R.; SCHULL, J.; JONES, D.L.; ALLMAN, R. 2009. Early life history stages of goliath grouper *Epinephelus itajara* (Pisces: Epinephelidae) from Ten Thousand Islands, Florida. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 221-228.
- LEGARE, B.; MAIZE, K.; NEMETH, R. 2011. Juvenile Nassau Grouper (*Epinephelus striatus*) Utilization of Nearshore Habitats with Evidence of Adult Connectivity to a Spawning Aggregation Site. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 63: 198-199.
- LEIPE, T.; KNOPPERS, B.; MARONE, E.; CAMARGO, R. 1999. Suspended matter transport in coral reef waters of the Abrolhos Bank, Brazil. *Geo-Marine Letters* 19(3): 186–195.
- LIBRADO, P.; ROSAS, J. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LÓPEZ-RIVERA, M.M. & SABAT A.M. 2009. Effects of a marine fishery reserve and habitat characteristics in the abundance and demography of the red hind grouper, *Epinephelus guttatus* *Caribbean Journal of Science* 45(2-3) 348-362.
- LUGENDO, B.R.; NAGELKERKEN, I.; VAN DER VELDE, G.; MGAYA, Y.D. 2006. The importance of mangroves, mud/sand flats and seagrass beds as feeding areas for juvenile fish in Chwaka Bay, Zanzibar: gut content and stable isotope analysis. *J. Fish Biol.* 69: 1639–1661. DOI::10.1111/j.1095-8649.2006.01231.x
- LUIZ JR., O. J.; CARVALHO-FILHO, A.; FERREIRA, C. E. L.; FLOETER, S. R.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. 2008. The reef fish assemblage of the Laje de Santos Marine State Park, Southwestern Atlantic: annotated checklist with comments on abundance, distribution, trophic structure, symbiotic associations, and conservation. *Zootaxa, Auckland* 1807: 1-25.
- MACHADO, L.F.; BERTONCINI, A.A.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J.P. 2003. Habitat use by the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and its relative abundance, in Santa Catarina, Brazil. *Aqua. J. Ichthyol. Aquatic Biol.* 6(4): 133-138.
- MAGGIO, T; ANDALORO, F.; ARCULEO, M. 2005. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321: 83– 92.
- MAGGIO, T; ANDALORO, F.; ARCULEO, M. 2006, Genetic population structure of *Epinephelus marginatus* (Pisces, Serranidae) revealed by two molecular markers. *Italian Journal of Zoology* 73(3): 275–283.
- MANN, D.A.; LOCASCIO, J.V.; COLEMAN, F.C.; KOENIG, C.C. 2009. Goliath grouper *Epinephelus itajara* sound production and movement patterns on aggregation sites. *Endangered Species Research (ESR)*. 7: 229–236. DOI: 10.3354/esr00109

- MARQUES, S. & FERREIRA, B.P. 2011. Sexual development and reproductive pattern of the Mutton hamlet, *Alphestes afer* (Teleostei: Epinephelidae): a dyandric, hermaphroditic reef fish. *Neotropical Ichthyology* 9(3): 547-558.
- MATOCQ, M.D.; VILLABLANCA, F.X. 2001. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation* 98 : 61-68.
- McCLENACHAN, L. 2009. Historical declines of goliath grouper populations in South Florida, USA. *Endangered Species Research*: 1-7. DOI: 10.3354/esr00167
- MEDEIROS, D.V.; NUNES, J.A.C.C.; SAMPAIO, C.L.S. 2009. A mutton hamlet *alphestes afer* (Bloch, 1793) reproductive event in northeast Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Science* 4(2): 212-215.
- MEJÍA-LADINO, L.M.; BETANCUR-R., R.; ACERO P., A.; GRIJALBA B., M. 2003. Presencia de *Epinephelus nigritus* (Pisces: Serranidae) em el Caribe Colombiano, Incluyendo una Clave para lãs Espécies de *Epinephelus* em el Área. *Boletín Ecológico: Ecosistemas Tropicales* 37: 31-39.
- MENDONÇA, F.F.; HASHIMOTO, D.T.; DE-FRANCO, B.A.; PORTO-FORESTI, F.; GADIG, O.B.F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2009. Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. *Conservation Genetics Resources* 2: 31–35. DOI 10.1007/s12686-009-9131-7
- MORA, C.; SALE, P.F. 2002. Are populations of coral reef fishes open or closed? *Trends in Ecology and Evolution* 17: 422-428.
- MORRIS, A.V.; ROBERTS, C.M.; HAWKINS, J.P. 2000. The threatened status of groupers (Epinephelinae). *Biodiversity and Conservation* 9: 919–942.
- MUNRO, J.L.; BLOK, L. 2005. The Status of Stocks of Groupers and Hinds in the Northeastern Caribbean. *of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 56: 283-294.
- MURIE, D.; PARKYN, D.; KOENIG, C.C.; COLEMAN, F.C.; SCHULL, J.; FRIAS-TORRES, S. 2009. Evaluation of finrays as a non-lethal ageing method for protected goliath grouper *Epinephelus itajara* in Florida. *Endangered Species Res.* 7: 213–220. DOI: 10.3354/esr00146
- MUSS, A.; ROBERTSON, D.R.; STEPIEN, C.A; WIRTZ, P.; BOWEN, B.W. 2001. Phylogeography of Ophioblennius: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution*,55: 561–572.
- NAGELKERKEN, I.; DORENBOSCH, M.; VERBERK, W.C.E.P.; COCHERET DE LA MONIÉRE, E.; VAN DER VELDE, G. 2000. Importance of shallow-water biotopes of a Caribbean bay for juvenile coral reef fishes: patterns in biotope association, community structure and spatial distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 202: 175–192.
- NAGELKERKEN, I.; BLABER, S.J.M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L.G.; MEYNECKE, J.O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H.M.; SASEKUMAR, A.; SOMERFIELD, P.J. 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany* 89: 155–185. DOI: 10.1016/j.aquabot.2007.12.007
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEMETH, R.S.; KADISON, E.; HERZLIEB, S.; BLONDEAU, J.; WHITEMAN, E.A. 2006. Status of a yellowfin (*Mycteroperca venenosa*) grouper spawning aggregation in the US Virgin Islands with notes on other species. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 57: 541-558.
- OGDEN, J.C; DAVIS, S.M.; BARNES, T.K.; JACOBS, K.J.; GENTILE, J.H. 2005. Total system conceptual ecological model. *Wetlands* 25: 955–979.
- OGDEN, R. 2008. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* 9: 462–472.

- OLIVEIRA, I.M.; HAZIN, F.; OLIVEIRA, V.S.; GEBER, F.; OLIVEIRA, G.J.; BARRADAS, R. 2007. Distribuição e Abundância Relativa de Peixes Capturados com Espinhel de Fundo na Costa de Pernambuco, Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo 33(2): 183-193.
- OSÓRIO, F.M.; GODINHO, W.O.G.; LOTUFO, T.M.C. 2011. Ictiofauna associada às raízes de mangue do estuário do Rio Pacoti – CE, Brasil. *Biota Neotrop.* 11(1): 415-420.
- PAIVA, A.C.G.; CHAVES, P.T.C.; ARAÚJO, M.E. 2008. Estrutura e organização trófica da ictiofauna de águas rasas em um estuário tropical. *Rev. Bras. Zool.* 25(4):647-661.
- PALUMBI, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25: 547-572.
- PALUMBI, S.R. 2003. Population Genetics, Demographic Connectivity, and the Design of Marine Reserves. *Ecological Applications* 13(1) Supplement: 146-158.
- PARRISH, J.D. 1989. Fish communities of interacting shallow-water habitats in tropical oceanic regions. *Marine Ecology Progress Series* 58: 143-160.
- PATERSON, A. W.; WHITFIELD, A. K. 2000. Do shallow-water habitats function as refugia for juvenile fishes? *Estuarine Coastal and Shelf Science, Amsterdam* 51: 359-364.
- PAULY, D.; CHRISTENSEN, V.; SYLVIE, G.; PITCHER, T.J.; SUMAILA, U.R.; WALTERS, C.J.; WATSON, R.; ZELLER, D. 2002. Towards sustainability in world fisheries. *Nature* 418: 689-695.
- PHELAN, M.J. 2008. Report on the Goliath Grouper Aggregation and Spawning Monitoring at Jupiter, Florida. Unpublished report, Florida Oceanographic Coastal center. Hutchinson Island, Florida. 21 pp.
- PINA-AMARGÓS, F.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G. 2009. Movement patterns of goliath grouper *Epinephelus itajara* around southeast Cuba: implications for conservation. *Endangered Species Research (ESR)* 7: 243-247. DOI: 10.3354/esr00192
- PINHEIRO, H.T.; CAMILATO, V.; GASPARINI, J.L.; JOYEUX, J.C. 2009. New records of fishes for Trindade-Martin Vaz oceanic insular complex, Brazil. *Zootaxa* 2298: 45-54
- PORTNOY, D.S.; HOLLENBECK, C.M.; RENSHAW, M. A.; CUMMINGS, N.J.; GOLD, J.R.. 2013. Does mating behaviour affect connectivity in marine fishes? Comparative population genetics of two protogynous groupers (Family Serranidae). *Molecular Ecology* 22: 301-313. DOI: 10.1111/mec.12128
- PUMITINSEE, P. SENANAN, W. NANAKORN, U.; KAMONRAT, W.; KOEDPRANG, W. 2009. Temporal genetic heterogeneity of juvenile orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Pisces: Serranidae). *Aquaculture Research* 40: 1111-1122. DOI::10.1111/j.1365-2109.2009.02206.x
- RAMÍREZ, M.A.; PATRICIA-ACEVEDO, J.; PLANAS, S.; CARLIN, J.L.; FUNK, S.M. & MCMILLAN, W.O. 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae) *Molecular Ecology Notes* 6: 813-817.
- RAVAGO-GOTANCO, R. G. ; MANGLICMOT, M. T. & PANTE, M. J. R. (2010) Multiplex PCR and RFLP approaches for identification of rabbitfish (*Siganus*) species using mitochondrial gene regions. *Molecular Ecology Resources* 10: 741-743. DOI: 10. 1111/j. 1755-0998. 2009. 02829. x
- REUSS-STRENZEL, G.M.; ASSUNÇÃO, M.F. 2008. Etnoconhecimento ecológico dos caçadores submarinos de Ilhéus, Bahia, como subsídio à preservação do mero (*Epinephelus itajara* Lichtenstein, 1822). *Revista da Gestão Costeira Integrada* 8(2):203-219.
- REYNAL, L.; DRUAULT-AUBIN, V.; LAGIN, A. & RIVOALEN, J.J. 2004. Fishing on Spawning Aggregation Sites of Groupers in Martinique (Mutton hamlet – *Alphistes afer*. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 55: 608-613.

- RICHARDSON, L.R.; GOLD, J.R. 1997. Mitochondrial DNA diversity in and population structure of red grouper *Epinephelus morio*, from the Gulf of México. *Fishery Bulletin* 951: 174-179.
- RIVERA, M.A.; KELLEY, C.D.; RODERIC, G.K. 2008. Subtle population genetic structure in the Hawaiian grouper, *Epinephelus quernus* (Serranidae) as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 449-468.
- RIVERA, M.A.J.; ANDREWS, K.R.; KOBAYASHI, D.R.; WREN, J.L.K.; KELLEY, C.; RODERICK, G.K.; TOONEN, R.J. 2011. Genetic Analyses and Simulations of Larval Dispersal Reveal Distinct Populations and Directional Connectivity across the Range of the Hawaiian Grouper (*Epinephelus quernus*). *Journal of Marine Biology*: 1-11. DOI:10.1155/2011/765353
- ROCHA, L.A. 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr.* 30: 1161-1171.
- ROCHA, L.A.; ROBERTSON, D.R.; ROCHA, C.R.; VAN TASSELL, J.L. CRAIG, M.T.; BOWEN, B.W. 2005. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14: 3921-3928. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02698.x
- ROCHA, M.S.P.; MOURÃO, J.S.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D.; ALVES, R.R.N. 2008. O Uso dos Recursos Pesqueiros no Estuário do Rio Mamanguape, Estado da Paraíba, Brasil. *Interciência* 33(12): 903-909.
- ROCHA, M.L.C.F.; FERNANDEZ, W.S.; FILHO, A.M.P. 2010. Spatial and Temporal Distribution of Fish in Palmas Bay, Ubatuba, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58(1): 31-43.
- RODRIGUES, R.; SCHNEIDER, H.; SANTOS, S.; VALLINOTO, M.; SAIN-PAULZ, 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.
- RODRIGUES, K.F.; SHIGEHARU, S.; CH'NG, C.L. 2011. Microsatellite Markers for the Identification of Commercially Important Groupers *Epinephelus lanceolatus*, *Cromileptes altivelis* and *Epinephelus fuscoguttatus* *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34 (2): 311 -315.
- ROGERS, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49:608-615.
- ROGERS, A.R.; HAPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-559.
- ROOKER, J.R.; DOKKEN, Q.R.; PATTENGILL, C.V.; HOLT, G.J. 1997. Fish assemblages on natural and artificial reefs in the Flower Garden Banks National Marine Sanctuary, USA. *Coral Reefs* 16: 83-92.
- ROSS, S.W.; MOSER, M.L. 1995. Life History of Juvenile Gag, *Myxerperca microlepis*, in North Carolina Estuaries. *Bulletin of Marine Science* 56(1): 222-237.
- ROUGHGARDEN, J. 1974. Species packing and the competition function with illustrations from coral reef fish. *Theoretical Population Biology* 5:163-186.
- ROWE, S.; HUTCHINGS, J.A. 2003. Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18 (11): 567-572. DOI: 10.1016/j.tree.2003.09.004
- SADOVY, Y. 1994. Grouper stocks in the western central Atlantic: the need for management and management needs. *Proceeding of the Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 43: 43-64.
- SADOVY, Y.; ROSARIO, A.; ROMAN, A. 1994. Reproduction in a aggregating grouper, the red hind *Epinephelus guttatus*. *Envir. Biol. Fish* 41: 269-286.

- SADOVY, Y.; EKLUND, A.M. 1999. Synopsis of biological information on the Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, (Bloch 1792), and the jewfish, *E. itajara* (Lichtenstein 1822). NOAA Technical Report, NMFS 146, and FAO Fisheries Synopsis 157. 65 p.
- SADOVY DE MITCHESON, Y. ; CRAIG, M. T. ; BERTONCINI, A. A. ; CARPENTER, K. E. ; CHEUNG, W. W. L. ; CHOAT, J. H. ; CORNISH, A. S. ; FENNESSY, S. T. ; FERREIRA, B. P. ; HEEMSTRA, P. C. ; LIU, M. ; MYERS, R. F. ; POLLARD, D. A. ; RHODES, K. L. ; ROCHA, L. A. ; RUSSELL, B. C. ; SAMOILYS, M. A. & SANCIANGCO, J. (2012). Fishing groupers towards extinction: a global assessment of threats and extinction risks in a billion dollar fishery. *Fish and Fisheries*: 1-18. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2011.00455.x
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C.; HUTCHISON III, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA *Nature* 265: 687 - 695 DOI:10.1038/265687a0
- SAZIMA, I.; KRAJEWSKE, J.P.; BONALDO, R.M.; SAZIMA, C. 2005. Wolf in a sheep's clothes: juvenile coney (*Cephalopholis fulva*) as an aggressive mimic of the brown chromis (*Chromis multilineata*) *Neotropical Ichthyology* 3(2):315-318.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G. & ADAIME, R.R. 1990. Variability of mangrove ecosystems along the brazilian coast. *Estuaries* 13(2): 201-218.
- SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*. 152: 1079–1089.
- SEDBERRY, G.R.; PASHUK, O.; WYANSKI, D.M.; STEPHEN, J.A.; WEINBACH, P. 2006. Spawning Locations for Atlantic Reef Fishes off the Southeastern U.S. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 57: 463-514.
- SEITZ, R.D., WENNHAGE, H., BERGSTRÖM, U., LIPCIUS, R.N., and YSEBAERT, T. 2013. Ecological value of coastal habitats for commercially and ecologically important species. *ICES Journal of Marine Science*. DOI:10.1093/icesjms/fst152.
- SEYOUM, S.; TRINGALI, M.D.; BARTHEL, B.L.; PUCHULUTEGUI, C.; DAVIS, M.C.; COLLINS, A.B.; CRAIG, M.T. 2013. Isolation and characterization of 29 polymorphic microsatellite markers for the endangered Atlantic goliath grouper (*Epinephelus itajara*), and the Pacific goliath grouper (*E. quinquefasciatus*). *Conservation Genet Resour*. DOI 10.1007/s12686-013-9892-x
- SHERIDAN, P.; HAYS, C. 2003. Are mangroves nursery habitat for transient fishes and decapods? *Wetlands* 23: 449–458
- SHIELDS, G.F.; GUST, J.R. 1995. Lack of geographic structure in mitochondrial DNA sequences of the Bering Sea walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4: 69-82.
- SHIVJI, M.; CLARKE, S.; PANK, M.; NATANSON, L.; KOHLER, N.; STANHOPE, M. 2002. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology* 16: 1036-1047.
- SHULMAN, M.J.; BERMINGHAM, E. 1995. Early life histories, ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution* 49: 897–910.
- SILVA, M.A.B.; E. BERNINI & T.M.S. CARMO 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta Bot. Brasil*. 19(3):465-471.
- SILVA-OLIVEIRA, G.C.; RÊGO, P.S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. & VALLINOTO, M. 2008. Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper *Epinephelus itajara*, (Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 988-994.

- SILVA-OLIVEIRA, G.C.; SILVA, A.B.C.; OLIVEIRA, Y.; NUNES, Z.P.; TORRES, R.A.; SAMPAIO, I.; VALLINOTO, M. 2012. New nuclear primers for molecular studies of Epinephelidae fishes. *Conservation Genet Resour* 5: 165–168 DOI 10.1007/s12686-012-9759-6
- SIMON, T.; PINHEIRO, H.T.; JOYEUX, J.C. 2011. Target fishes on artificial reefs: Evidences of impacts over nearby natural environments. *Science of the Total Environment* 409 (2011) 4579–4584. DOI:10.1016/j.scitotenv.2011.07.057
- SLUKA, R.D.; CHIAPPONE, M.; SULLIVAN SEALEY, K.M. 2001. Influence of habitat on grouper abundance in the Florida Keys, U.S.A. *Journal of Fish Biology* 58: 682–700. DOI:10.1006/jfbi.2000.1478
- SMITH, C. L. 1971. A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 146: 67–241.
- SPALDING, M.D.; FOX, H.E.; ALLEN, G.R.; DAVIDSON, N.; FERDAÑA, Z.A.; FINLAYSON, M.; HALPERN, B.S.; JORGE, M.A.; LOMBANA, A.; LOURIE, S.A.; MARTIN, K.D.; MCMANUS, E. MOLNAR, J. RECCHIA, C.A. & ROBERTSON, J. 2007. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57(7): 573-583. DOI: <http://dx.doi.org/10.1641/B570707>
- STEVENSON, D.E; CHAPMAN, R.W.; SEDBERRY, B.R. 1998. Stock Identification in Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, Using Microsatellites DNA Analysis. *Proceedings of the 50th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*: 729-747.
- STEWART, B.D.; JONES, G.P., 2001. Associations between the abundance of piscivorous fishes and their prey on coral reefs: implications for prey fish mortality. *Mar. Biol.* 138, 383– 397.
- STRAMMA, L.; ENGLAND, M. 1999. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *J. Geophys. Res.* 104(C9): 20863–20883.
- SUGUIO, K.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; FLEXOR, J.M.; AZEVEDO, A.E.G. de 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências* 15: 273–286.
- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphisms. *Genetics* 123: 597–601.
- TAMURA, R.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2732-2739.
- TEIXEIRA, C.E.P.; LESSA, G.C.; CIRANO, M.; LENTINI, C.A.D. 2013. The inner shelf circulation on the Arolhos Bank, 18°S, Brazil. *Continental Shelf Research* 70: 13–26.
- TORRES, R.A.; FEITOSA, R.B.; CARVALHO, D.C.; FREITAS, M.O.; HOSTIM-SILVA, M.; FERREIRA, B.P. 2013. DNA barcoding approaches for fishing authentication of exploited grouper species including the endangered and legally protected goliath grouper *Epinephelus itajara*. *Scientia Marina* 77(3): 409-418. DOI: 10.3989/scimar.03805.29A
- TROTTA, M.; SCHÖNHUTH, S.; PEPE, T.; CORTESI, M.L.; PUYET, A.; BAUTISTA, J.M. 2005. Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2039-2045. DOI: 10.1021/jf048542d
- ULRICH, R. M. ; JOHN, D. E. ; BARTON, G. W. HENDRICK, G. S. ; FRIES, D. P. & PAUL, J. H. (2013) Ensuring seafood identity: Grouper identification by real-time nucleic acid sequence-based amplification (RT-NASBA). *Food Control* 31: 337-344. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.012

- VILA-NOVA, D.A.; BENDER, M.G.; CARVALHO-FILHO, A.; FERREIRA, C.E.L.; FLOETER, S.R. 2011. The Use of Non-reef Habitats by Brazilian Reef Fish Species: Considerations for the Design of Marine Protected Areas. *Natureza & Conservação* 9(1): 1-8DOI: 10.4322/natcon.00901001
- VILAR, C.C.; SPACH, H.L.; SANTOS, L.O. 2011. Fish fauna of Baía da Babitonga (southern Brazil), with remarks on species abundance, ontogenic stage and conservation status. *Zootaxa* 2734: 40–52.
- VILAR, C.C.; JOYEUX, J.C.; GIARRIZZO, T.; SPACH, H.L.; VIEIRA, J.P.; VASKE-JUNIOR, T. 2013. Local and regional ecological drivers of fish assemblages in Brazilian estuaries. *Marine Ecology Progress Series* 485: 181–197.
- XIA, X. 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 276.
- XIA, X & XIE, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- XIMENES-CARVALHO, M.O.; FONTELES-FILHO, A.A.; TUBINO, R.A.; ANDRADE-TUBINO, M.F.; PAIVA, M.P. 1999. Parâmetros de Crescimento e Mortalidade do Cherne, *Epinephelus niveatus* (Valenciennes) (Osteichthyes: Serranidae), no Sudeste do Brasil. *Arq. Ciên. Mar.* 32: 111-117.
- WARD, R.; FIGUEROLA, M.; LUCKHURST, B.E.; BLANDON, I.V. & KAREL, W.J. 2002. Genetic Characterization of Red Hind, *Epinephelus guttatus* Collected from Three Spawning Aggregations in Western Puerto Rican Waters – Variation in Allozymes, *Gulf an Caribbean Fisheries Institute* 53: 460-471.
- WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; P. R. LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 360: 1847–1857. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716
- WASCO, A.P.; C. MARTINS; C. OLIVEIRA & F. FORESTI 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales *Hereditas* 138: 161–165.
- WAYCOTT, M.; DUARTE, C.M.; CARRUTHERS, T.J.B.; ORTH, R.J.; DENNISON, W.C.; OLYARNIK, S.; CALLADINE, A. FOURQUREAN, J.W.; HECK Jr.; HUGHES, A.R.; KENDRICK, G.A. KENWORTHY, W.J.; SHORT, F.T.; WILLIAMS, S.L. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *PNAS* 106(30): 12377–12381. DOI: 10.1073_pnas.0905620106.
- WEERSING, K.; TOONEN, R.J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 393: 1–12. DOI: 10.3354/meps08287
- WHAYLEN, L.; PATTENGILL-SEMMENS, C.V.; SEMMENS, B.X.; BUSH, P.G.; BOARDMAN, M.R. 2004. Observations of a Nassau Grouper (*Epinephelus striatus*) Spawning Aggregation Site In Little Cayman, Including Multi-Species Spawning Information. *Environ. Biol. Fish.* 70: 305-313.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- ZABEL, M.; WAGNER, T.; MENOICAL, P. 2003. Terrigenous Signals in Sediments of the Low-Latitude Atlantic - Indications to Environmental Variations during the Late Quaternary: Part II: Lithogenic Matter in WEFER G (eds), 2003, *Sonderforschungsbereich 261*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O.; CHAPMAN, R.W. 2002.Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci*(Teleostei: Serranidae). *Molecular Ecology Notes* 2: 217–219.
- ZATCOFF, M.S.; BALL, A.O.; SEDBERRY, G.R. 2004.Population genetic analysis of red grouper, *Epinephelus morio*, and scamp, *Mycteroperca phenax*, from the southeastern U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 144:769–777.