

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISE DA VARIAÇÃO GEOGRÁFICA EM CLUPEÍDEOS: REVISÃO DE METODOLOGIAS, SÍNTESE DE CONCEITOS E APLICABILIDADE

*Clarissa Alessandra Lemos, **Dulci do Nascimento Fonseca Vagenas,
***André Martins Vaz-dos-Santos

*Instituto de Pesca, clarissabsb@yahoo.com.br, **Universidade Paulista e da Universidade São Judas Tadeu,
***Universidade São Judas Tadeu, Universidade Santa Cecília, Instituto de Pesca

RESUMO

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, é a espécie-alvo da pesca com cerco (traineira) e, como fauna acompanhante ocorrem outras espécies, como as sardinhas laje e cascuda, *Opisthonema oglinum* e *Harengula clupeola*, cuja importância pesqueira tem aumentado. Esses peixes (pequenos pelágicos) possuem distribuição em grandes áreas, destacando a Bacia Sudeste do Brasil, região na qual podem existir diferentes estoques pesqueiros, o que torna importante o estudo da variabilidade genética dessas espécies. Contudo, para realizar esses estudos é necessário escolher um marcador molecular apropriado. No presente estudo revisaram-se os marcadores moleculares utilizados para detectar variabilidade genética e variação geográfica, verificando sua aplicação em peixes. A análise da variação geográfica permite observar se há fluxo gênico a partir do estudo da variabilidade genética. Os marcadores STR e DNA mitocondrial se mostraram os melhores e mais utilizados para estudos populacionais de peixes, por possuírem características únicas. Em *O. oglinum* e *H. clupeola* não foram encontradas referências sobre estudos moleculares aplicados, sendo feitas recomendações direcionadas ao estudo destas importantes espécies.

Palavras-chave: *Harengula clupeola*; *Opisthonema oglinum*; marcadores moleculares; estoques pesqueiros.

1. Introdução

No Estado de São Paulo a pesca com cerco (traineiras) é a principal arte de pesca que captura pequenos peixes pelágicos de grande importância econômica, principalmente os pertencentes à ordem Clupeiformes, família Clupeidae (INSTITUTO DE PESCA, 2012). Destaca-se nesta pescaria a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1789) espécie-alvo distribuída na Bacia Sudeste do Brasil (região entre o Cabo Frio, RJ, e o Cabo de Santa Marta Grande, SC) e que constitui a maior parte das capturas. Entretanto, também apresentam importância outros pequenos pelágicos, com as sardinhas laje e cascuda, além de outras espécies (LONGHURST ; PAULY, 2007). Estas espécies ocorrem em águas costeiras tropicais e subtropicais, vivendo agrupadas em grandes cardumes que, dependendo da idade, se encontram mais próximos ou mais afastados da costa (FELTRIM ; SCHWINGEL, 2005).

A sardinha-verdadeira, enquanto espécie-alvo, tem sido amplamente estudada, como se pode constatar em sínteses históricas como a de ROSSI-WONGTSCHOWSKI et al. (1995) e a recente de CERGOLE e DIAS NETO (2011). Em contrapartida, as espécies associadas a sua pescaria não tem recebido a

mesma atenção, o que torna estudos a elas direcionados especialmente importantes, principalmente em função de grandes variações nas suas produções pesqueiras (CHECKLEY et al., 2009).

A sardinha-laje, *Opisthonema oglinum* (Le-seuer, 1818), ocorre no Atlântico Ocidental desde o Golfo do Maine, Estados Unidos, até Santa Catarina, Brasil, em regiões pelágicas marinhas e estuarinas (MENEZES et al., 2003). É considerada a principal espécie alternativa para manter o fornecimento de matéria prima para o setor pesqueiro industrial frente ao declínio das capturas de sardinha-verdadeira (FELTRIM ; SCHWINGEL, 2005).

A sardinha-cascuda, *Harengula clupeola* (Cuvier, 1829), também ocorre no Atlântico Ocidental, se distribuindo da Flórida, EUA até São Paulo, Brasil. Vivem em cardumes pequenos, entrando em baías e estuários para reprodução (SPACH et al. 2003; GODEFROID et al., 2004; FÁVARO, 2004; PICHLER, 2005). Comumente é utilizada como isca em outras pescarias, pois forma densos cardumes em algumas épocas do ano (SOTO, 2001).

A variação geográfica tem sido amplamente estudada em espécies terrestres e marinhas, sendo um tema de grande interesse para a conservação da biodiversidade (LEATHWICK et al., 2006). Muitos são os

elementos que causam variação geográfica, sendo importante identificar sua origem e efeitos nas espécies, populações ou comunidades (AUSTIN, 2007).

Fundamentalmente, quando há variação geográfica verifica-se que não apenas o fluxo gênico caracteriza uma espécie, mas também as condições ambientais locais e acontecimentos históricos (SOTKA et al., 2004). O fluxo gênico causado pela migração, por exemplo, pode desfazer adaptações para condições locais e atuar contrariamente à diferenciação evolutiva intra e interpopulacional (GEE et al., 2009).

A teoria clássica da genética de populações sugere que quanto mais populações locais migrarem e intercruzarem, mais geneticamente similares elas serão (GARANT et al., 2005). Esse conceito parece estar de acordo com o senso comum, pois assume que o fluxo gênico é um processo casual. Mas a dispersão não casual pode na verdade favorecer a adaptação local e a diferenciação evolutiva (GEE et al., 2009).

A estrutura genética das espécies de peixes marinhos tropicais reflete a relação histórica e contemporânea entre uma série de processos ecológicos, demográficos, comportamentais, genéticos, oceanográficos, climáticos e tectônicos (SOTKA et al., 2004). Os efeitos combinados desses mecanismos, atuando em escala temporal e espacial, determinam as taxas e padrões de dispersão de ovos, larvas e adultos. São esses movimentos, aliados a sobrevivência e sucesso reprodutivo dos migrantes que, por sua vez, controlam a escala em que processos casuais (deriva genética) e deterministas (seleção natural) (GROSBERG ; CUNNINGHAM, 2001).

O estudo da variabilidade genética intra e interespecífica é utilizado para se obter uma melhor compreensão da dinâmica de populações em unidades de conservação, quantificação do grau de estruturação geográfica destas populações, medição de graus de diversidade genética e consanguinidade, análises filogenéticas e filogeográficas (AVISE, 2000).

Em geral, muitos estudos têm sido realizados com o uso de técnicas de biologia molecular visando entender a variabilidade genética em populações naturais, estudar o fluxo gênico entre as espécies, os processos naturais de hibridação e relações filogenéticas (SILVA, 2000; GROSBERG ; CUNNINGHAM, 2001; MATIOLI, 2001; MARQUES, 2002; SOTKA et al., 2004; TORRES et al., 2004; GARANT et al., 2005; SEDDON et al., 2005; GRATTAPAGLIA et al., 2008, entre outros).

A detecção da variabilidade através de marcadores genéticos permite acessar informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos e análises de paternidade e parentesco (AVISE, 2000; SIVASUNDAR et al., 2001; FÉRAL, 2002).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo revisar as técnicas utilizadas para detectar variabilidade genética e a variação geográfica nos peixes da ictiofauna marinha, verificando sua aplicabilidade às espécies de clupeídeos, importantes recursos pesqueiros.

2. Materiais e Métodos

A partir da consulta em livros técnicos e em bases de dados de artigos científicos (SciELO; Scirus – que inclui as editoras Elsevier, Springer, Blackwell; Google Acadêmico) com os termos (em português e inglês): genética, Clupeidae, biologia molecular, *Harengula* e *Opisthonema*, foram obtidos

artigos de fontes acadêmicas confiáveis para estudo e revisão do tema. Estes textos foram obtidos *online* (quando possível) e em visitas às bibliotecas das seguintes instituições: Universidade Santa Cecília, Universidade de São Paulo (diversas unidades), Universidade São Judas Tadeu e Instituto de Pesca. Os conteúdos foram analisados e o tema foi estruturado, sendo os resultados e a discussão apresentados a seguir.

3. Resultados e Discussão

Técnicas Moleculares

Análises moleculares são fundamentais para conhecer a estrutura populacional e a distribuição geográfica das linhagens dos peixes. Os marcadores mitocondriais tem se mostrado uma importante ferramenta na detecção de variabilidade genética em peixes, além de permitirem inferências sobre as relações evolutivas entre populações que são de grande utilidade para estudos filogeográficos (AVISE 2000).

Nas últimas quatro décadas muitos estudos foram realizados com marcadores moleculares aplicados a diferentes espécies de animais e plantas (FERGUSON et al., 1995; FARALDO et al., 2002; FÉRAL, 2002; PRIOLI et al., 2003; HILSDORF et al., 2006; GRATTAPAGLIA et al., 2008, entre outros). Isso foi possível devido ao surgimento de sofisticadas técnicas de resolução de polimorfismos de proteínas e DNA (TORRES et al., 2004).

Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal (larval, juvenil ou adulto), podendo ser utilizados como rotina para monitorar a diversidade genética (FERGUSON et al., 1995).

Estudos genéticos em populações de peixes têm sido realizados utilizando-se marcadores bioquímicos e moleculares, tais como: aloenzimas, isoenzimas, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SPAR (Single Primer Amplification Reaction - Reação de amplificação com primer único), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats - Número variável de repetições em Tandem - microssatélites) e STR (Short Tandem Repeats - Repetições curtas em Tandem) ou SSR (Simple sequences repeats - sequências de repetições simples) (MARQUES, 2002), SNPs (Single nucleotide polymorphism - variações pontuais nas cadeias de nucleotídeos) e marcadores mitocondriais. Estas técnicas são comentadas a seguir.

- Aloenzimas – geralmente apresentam de 1 a 6 alelos por locus. Assim, com um tamanho amostral de 30 a 50 indivíduos por população, é provável amostrar todos os alelos e a variação total dos alelos amostrados. A questão do número de alelos e do tamanho amostral mínimo necessário é de fundamental importância para se detectar a significância da heterogeneidade genética entre populações (HILSDORF et al., 2006).

- Isoenzimas – constitui numa maneira rápida, simples e de alto valor informativo de avaliar genotipicamente muitos locus em um grande número de indivíduos (SILVA, 2000; FARALDO et al., 2002).

- RAPD – Pelo fato de se basearem na técnica de PCR, conferem uma série de vantagens em relação a outros tipos de marcadores tais como: rapidez na obtenção de dados genéticos da espécie a ser estuda-

da; custo menor em função da visualização direta dos fragmentos amplificados em gel; boa confiabilidade, uma vez que já foi demonstrada a reprodutibilidade da técnica em outros laboratórios (OLIVEIRA, 2005).

- SPAR - utiliza um único primer com sequência repetitiva de um microssatélite ou SSR. O segmento de DNA amplificado compreende aquele localizado entre dois blocos de microssatélites. Ele detecta diferenças entre espécies próximas, apesar de revelar pouca variabilidade dentro de uma mesma espécie (PRIOLI et al., 2003).

- RFLP - Essa técnica envolve a clivagem do DNA por enzimas de restrição, a separação por eletroforese, em gel de agarose ou poliacrilamida, dos fragmentos gerados na clivagem e sua visualização em forma de bandas (MATIOLI, 2001).

- AFLP - constituem uma tecnologia que, segundo Matioli (2001) combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos através de PCR. O uso da metodologia inclui a identificação de genótipos (fingerprinting), o mapeamento genético localizado e a construção de mapas genéticos em plantas cultivadas.

- STR ou SSR - São microssatélites que estão envolvidos na regulação do processo de transcrição, visto que as proteínas envolvidas neste mecanismo contêm domínios ricos em glutaminas e repetições trinucleotídicas constituídas por sequências poliglutâmicas (ESCHER et al., 2000).

- VNTR - podem compor a classe de minissatélite, sequências de 1 a 5 Kb que consistem em números variáveis de uma unidade repetida de 15 a 100 nucleotídeos de comprimento (TORRES et al., 2004).

- SNP - são marcadores considerados muito promissores para estudos evolucionários, ecológicos ou de conservação, uma vez que a informação sobre a sequência genômica se torne disponível para as diversas espécies (SEDDON et al., 2005; MARRIS, 2009). Eles são inerentemente menos polimórficos que os microssatélites, mas são as fontes de variação genética mais comum e, conseqüentemente, existe um aumento substancial do número de loci disponíveis para diversas espécies. Além disso, a dinâmica mutacional mais simples dos SNPs leva a vantagem de gerar uma taxa menor de homoplasia, e, ainda mais importante, apresentam a capacidade de serem genotipados a baixo custo e em larga escala (BRUMFIELD et al., 2003).

- Marcadores mitocondriais - essa organela possui genoma próprio (DNAMt) e geralmente pequeno (15 a 20 kb), com grande número de variação nucleotídica e estrutura simples de organização, além de apresentar herança uniparental materna e ausência de recombinação. Estas características fazem com que um haplótipo mitocondrial possa servir para traçar uma genealogia ou até mesmo uma filogenia materna, o que muitas vezes pode ajudar a entender o modo de dispersão de muitos organismos (AVISE, 2000; BALLARD ; WHITLOCK, 2004).

Aplicação de Técnicas Moleculares à Clupeídeos

As sardinhas laje (*O. oglinum*) e cascuda (*H. clupeiola*) são espécies pelágicas que, por estarem associadas aos cardumes de sardinha-verdadeira, podem estar sujeitas aos efeitos de sua pescaria. Historicamente, *S. brasiliensis* apresentou registros recórcos de produção nos anos 1970 (CERGOLE ; ROSSI- WONGTSCHOWSKI, 2005), mas em 2000 sua pescaria colapsou e, desde então, tem havido alguns

sinais de recuperação (IBAMA, 2008). Mesmo com este cenário, dados de cruzeiros de pesquisa obtidos a partir de 2008 revelam fragilidade do estoque, sendo possível prognosticar quadros pouco promissores para a pescaria da espécie em relação ao seu histórico (VAZ-DOS-SANTOS et al., 2010).

São poucos os estudos realizados com *O. oglinum* e *H. clupeiola* (MAGRO et al., 2000). Estudos moleculares com essas espécies são importantes para verificar se ocorre fluxo gênico e variações intra e interpopulacionais em sua área de distribuição geográfica.

O melhor marcador molecular para estudos populacionais e de estoques de peixes é o STR, pois permite acessar a variabilidade genética em populações naturais. Seu resultado pode ser visualizado diretamente no PCR, a partir das regiões flanqueadas da ilha de repetições que geralmente são específicas no genoma e geram um padrão multilocus. O estudo com o marcador STR é vantajoso, pois já há uma automatização do processo, que consegue analisar o DNA mesmo que ele esteja degradado, além de haver uma alta confiabilidade em seus resultados.

Outro importante marcador é o DNA mitocondrial (DNAMt), pois seu genoma é considerado uma excelente fonte de informações genéticas para estudos evolutivos, populacionais e filogeográficos. O marcador mitocondrial é vantajoso por ser sensível aos efeitos da deriva genética, por não possuir íntrons, apresentar apenas 37 genes e não sofre recombinação. Em termos metodológicos, a técnica mais utilizada no estudo do polimorfismo do DNAMt consiste em amplificar a região controle (D-Loop), por meio da técnica de PCR e sequenciar o produto amplificado. Então, são verificadas mutações pontuais, inserções e deleções em relação à sequência padrão.

4. Conclusões

Tendo em vista a importância ecológica e pesqueira de *O. oglinum* e *H. clupeiola* aliada à necessidade de compreensão de sua estrutura populacional na Bacia Sudeste do Brasil, recomenda-se a aplicação das técnicas moleculares STR e DNAMt com fins à análise de fluxo gênico e variação geográfica.

Para a consecução destes objetivos, devem ser coletadas amostras frescas de músculo de exemplares provenientes (preferencialmente) de coletas científicas, para evitar alterações da amostra, como contaminação do DNA. As coletas devem ser feitas ao decorrer do ano abrangendo a área de ocorrência das espécies, sinoticamente para prevenir misturas (devido a deslocamentos ou migração), para que seja observada a existência ou não de variações geográficas que justifiquem a separação da espécie em diferentes estoques.

5. Referências

- Austin M. Species distribution models and ecological theory: a critical assessment and some possible new approaches. *Ecol. model.* 2007; 200(1-2): 1-19.
- Avise JC. *Phylogeography: the History and Formation of Species.* Harvard Univ Press, 2000.
- Ballard JWO, Whitlock MC. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 2004; 13:729-744.

- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in the inferences of population history. *Trends in Ecol and evol*, 2003; 18: 249-256.
- Cergole MC, Rossi-Wongtschowski CLDB, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). In: Cergole MC, Ávila-da-Silva AO, Rossi-Wongtschowski CLDB. (Org.). Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul: dinâmica das principais espécies em exploração. IO-USP. 2005; 145-150.
- Cergole MC, Dias Neto J. Plano de gestão para o uso sustentável da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* no Brasil. Ibama (Série Plano de Gestão dos Recursos Pesqueiros 5). 2011; 180p.
- Checkley D, Alheit J, Oozeki Y, Rou C. (eds.). Climate change and small pelagic fish. Cambridge: *Cambridge Univ Press*. 2009; 372p.
- Escher D, Bodmer-Glavas M, Barberis A, Schaffner W. Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:2774-2782.
- Faraldo MIF, Silva RM, Ando A, Veasey EA. Marcadores moleculares em mandioca. In: Cereda MP. Agricultura: tuberosas amiláceas Latino americanas. São Paulo-Fundação Cargill. 2002; 36-48,
- Fávaro LFA. Ictiofauna de áreas rasas do complexo estuarino Baía de Paranaguá, Paraná. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), UFSCAR. 2004; 80p.
- Feltrim MC, Schwingel PR. *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818). In: Cergole MC, Ávila-da-Silva AO, Rossi-Wongtschowski CLDB (eds). Análise das principais pescarias comerciais da região sudeste-sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração. IO-USP. 2005; p. 112-115
- Féral JP. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J Exp Mar Biol Ecol* 2002; 268:121-145.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodhol A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol*. 1995; 47A:103-126.
- Garant D, Kruuk LEB, Wilkin TA, McCleery RH, Sheldon BC. Evolution driven by differential dispersal within a wild bird population. *Nature*, 2005;433:6.
- Gee H, Howlett R, Campbell P. Um recurso da Nature para aqueles que queiram divulgar as evidências da evolução pela seleção natural. 2009.
- Godefroid RS, Spach HL, Queiroz GMLN, Schwarz JR. Mudanças temporais na abundância e diversidade da fauna de peixes do infralitoral raso de uma praia, sul do Brasil. *Iheringia - Série Zoolgia*, Porto Alegre. 2004; 94(1): 95-104.
- Grattapaglia D, Brondani RPV, Brondani C. Manual prático para desenvolvimento de marcadores microsatélites em plantas. Embrapa, 2008.
- Grosberg R, Cunningham CW. Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: Bertness, M. D., Gaines, S. D., Hay, M. E. *Mar Com Ecol* 2001: 61-83.
- Hilsdorf AWS, Resende EK, Marques DKS. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa. 2006: 44p.
- IBAMA. Relatório da reunião do subcomitê científico - Comitê de gestão do uso sustentável da sardinha-verdadeira. IBAMA, São Paulo. 2008; 41p.
- Instituto de Pesca. Informe da Produção Pesqueira Marinha e Estuarina do Estado de São Paulo: Dezembro de 2011. Instituto de Pesca, São Paulo, Informe Técnico. 2012; 17: 4p.
- Leathwick JR, Elith J, Francis MP, Hastie T, Taylor P. Variation in demersal fish species richness in the oceans surrounding New Zealand: an analysis using boosted regression trees. *Mar Ecol Prog S*. 2006; 321:267-281.
- Longhurst AR, Pauly D. *Ecologia de oceanos tropicais*. Ed. USP. 2007; 419 p.
- Magro M, Cergole MC, Rossi-Wongtschowski CLDB. Síntese dos conhecimentos dos principais recursos pesqueiros costeiros potencialmente exploráveis na costa Sudeste-Sul do Brasil: peixes. MMA/CIRM. 2000; 143p.
- Marques DKS. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. EMBRAPA. 2002; 36:22p.
- Marris E. The genome of the American West. *Nature*. 2009; 457: 950-952.
- Matioli SR. *Biologia Molecular e Evolução*. Ed. Holos, 202 p., 2001.
- Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL, Moura RL. Catálogo das Espécies de Peixes Marinhos do Brasil. São Paulo, Museu de Zoologia USP. 2003; 160p.
- Oliveira CG. Diversidade genética de ouriço-preto (*Chaetomys subspinosus*, OLFERS 1818 Rodentia: Erethizontidae) para auxiliar na elaboração de seu plano de manejo. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular), UESC. 2005; 59p.
- Pichler HA. A Ictiofauna em planícies de maré da Baía dos Pinheiros, Paraná. Dissertação (Mestrado em Zoologia), UFPR. 2005.
- Prioli AJ, Prioli MP, Prioli SMAP, Panarari RS, Bignotto TS, Maníglia TC, Carlos VA, Junior HFJ. Análise genética de *Pseudoplatystoma coruscans* (pintado) e *P. fasciatum* (cachara) e de um híbrido, com base em marcadores mitocondriais e nucleares. 2003.
- Rossi-Wongtschowski CLDB, Saccardo SA, Cergole MC. Situação do estoque da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) no litoral sudeste e sul do Brasil. IBAMA/Série Estudos. 1995; 17: 1-44.
- Seddon JM, Parker HG, Ostrander EA, Ellengren, H. SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Mol Ecol*. 2005; 14: 503-511.
- Silva RM. Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovarietades de mandioca, 131 fs., Tese (Doutorado), USP, 2000.
- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol Ecol*. 2001; 10: 407- 417.
- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK, Palumbi SR. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol Ecol*. 2004; 13:2143-2156.
- Soto JMR. Peixes do Arquipélago Fernando de Noronha. *Mare Magnum*. 2001; 1:147-169.
- Spach HL, Santos C, Godefroid RS. Padrões temporais na assembleia de peixes na gamboa do Sucuriú, baía de Paranaguá, Brasil, *R Bras Zool*. 2003; 20(4):591-600.
- Torres RA, Matoso DA, Artoni RF. Neotropical fish genetics. II. Molecular biology of neotropical fish. *Publ UEPG C Biol Saúde*. 2004; 10(2): 27-37.
- Vaz-dos-Santos AM, Alleman MM, Rossi-Wongtschowski CLDB, Cergole MC, Saccardo SA. Uso de otólitos para estudo do crescimento relativo da sardinha-verdadeira *Sardinella Brasiliensis* (Steindachner, 1879) Na região sudeste-sul do Brasil (22°S e 29°S). III CBO 2010 Rio Grande (RS), 2010.

