



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

**CONECTIVIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE *Mugil*
curema VALENCIENNES, 1836 (TELEOSTEI: MUGILIDAE) AO
LONGO DA REGIÃO COSTEIRA DE PERNAMBUCO E EM
ESTUÁRIOS ADJACENTES DO NORDESTE ORIENTAL DO
BRASIL.**

GUILHERME FERNANDEZ GONDOLO

RECIFE

2012

GUILHERME FERNANDEZ GONDOLO

CONECTIVIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE *Mugil curema* VALENCIENNES, 1836 (TELEOSTEI: MUGILIDAE) AO LONGO DA REGIÃO COSTEIRA DE PERNAMBUCO E EM ESTUÁRIOS ADJACENTES DO NORDESTE ORIENTAL DO BRASIL.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

Co-orientador: Prof. Dr. Diego Astúa de Moraes

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gondolo, Guilherme Fernandez

Conectividade genética e morfológica de *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) ao longo da região costeira de Pernambuco e em estuários adjacentes do Nordeste oriental do Brasil/ Guilherme Fernandez Gondolo– Recife: O Autor, 2012.

124 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Rodrigo Augusto Torres

Coorientador: Diego Astúa de Moraes

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Biologia Animal, 2012.**

Inclui bibliografia

- 1. Mugilidae 2. Genética de populações 3. Taxonomia
(Zoologia) I. Torres, Rodrigo Augusto (orientador) II.
Moraes, Diego Astúa (coorientador) III. Título**

597.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 060

GUILHERME FERNANDEZ GONDOLO

**CONECTIVIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE *Mugil curema*
VALENCIENNES, 1836 (TELEOSTEI: MUGILIDAE) AO LONGO DA
REGIÃO COSTEIRA DE PERNAMBUCO E EM ESTUÁRIOS ADJACENTES
DO NORDESTE ORIENTAL DO BRASIL.**

**Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biologia Animal,
da Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), Centro de
Ciências Biológicas, Departamento
de Zoologia, como parte dos
requisitos à obtenção do grau de
Doutor em Biologia Animal.**

APROVADA: 20 de dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
Membro externo
Univ. Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Beatrice Padovani Ferreira
Membro externo
Univ. Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Flávia Lucena Frédou
Membro externo
Univ. Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Rosângela P. Teixeira Lessa
Membro interno
Univ. Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco M. Santana da Silva
Membro externo
Univ. Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza
Membro interno (Suplente)
Univ. Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wagner Franco Molina
Membro externo (Suplente)
Univ. Federal do Rio Grande do Norte

Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma
pedrinha lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos.

Sir Isaac Newton

*Dedico este trabalho à Sofia,
que ainda nem chegou a esse
mundo, mas já é a alegria da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Dr. Rodrigo A. Torres e ao meu Co-orientador Dr. Diego A. de Moraes, pelo incentivo, pela paciência, por acreditar que eu pudesse desenvolver este trabalho e pelas valiosas críticas e sugestões para o aprimoramento deste.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de 22 meses de bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos financeiros investidos para o desenvolvimento desse projeto.

À Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Zoologia.

Ao Coordenador Dr. André Esteves em nome de todos do programa de Pós-graduação em Biologia Animal.

À todos do LAGEA pela ajuda e incentivo, principalmente aos colegas Filipe, Rafael, Emily e Diego.

À Dra. Semiramis J. H. Monte (UFPI), em nome de todos do LIB por disponibilizar as dependências e equipamentos, e pela ajuda para o desenvolvimento desta pesquisa.

À todos da Universidade Estadual do Piauí, minha nova casa, por diversos incentivos por permitir que esse trabalho fosse terminado.

Ao Dr. Ricardo Rosa (UFPB), Dr. Wagner Molina (UFRN); CEPNE-Tamandaré, IOUSP-Cananéia pelo auxílio logístico para que as coletas fossem realizadas.

Aos professores Dra. Elaine Malosso, Dr. Marcelo Guerra, Dr. Ana Benko e a todos de seus respectivos laboratórios pela ajuda.

À Dra. Iracilda Sampaio, Dr. Mauro Nirchio, Dr. Jean Dominic Durrand e Dr. Luiz A. Rocha pelas sugestões e artigos enviados.

À todos da Banca examinadora deste trabalho.

Aos colegas de profissão, que também são amigos, Dr. George Mattox, Dra. Pat Cunningham, Dra. Beth Araújo, Dra. Juliana Toledo, Msc. Renato Recoder, Dra. Juliana Rocisto, Dra. Alessandra Torres, Dr. Luiz Guilherme.

Aos Amigos Barbosa, Tex, Senador, Diniz, Jê, John, Dr. XXA, Porpeta, Ribeiro, Fabinho, Marlene, Kelly, Mara, Aninha, Julinha, que mesmo à distância sempre me ajudaram.

À todos os Fernandez, Gondolos e Ruggieros, minha enorme famílias pelo suporte e incentivo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram e que eu acabei esquecendo de citar nominalmente.

À minha Irmã Vera (Fera) Helena, minha linda sobrinha Stellinha, ao meu cunhado Cacá Cid e a meus avós José Carlos e Nelly.

Aos meus pais Geraldo e Graciela, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e incentivaram.

À minha linda esposa Maria Amélia, sem seu incentivo e paciência essa tese nunca teria sido terminada.

Muito Obrigado!

Este foi o primeiro produto em geração de informações científica e tecnológica e formação de recursos humanos do Grupo de Trabalho 2.4 do INCT - Ciências do Mar - Ambientes Marinhos Tropicais: Heterogeneidade Espaço-Temporal e Respostas à Mudanças Climáticas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	06
SUMÁRIO	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
<i>Mugilidae, potencial pesqueiro e Mugil curema Valenciennes, 1836. ...</i>	<i>19</i>
<i>DNA Barcoding.</i>	<i>26</i>
<i>PCR-RFLP.</i>	<i>28</i>
<i>Marcadores ISSR.</i>	<i>29</i>
<i>Morfometria Geométrica.</i>	<i>30</i>
2. CAPÍTULO 1 - DNA barcode e marcadores PCR-RFLPs: uma perspectiva das relações genético-evolutivas de <i>Mugil curema</i> Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) e entre espécies co-genéricas na costa brasileira.	32
2.1. RESUMO	33
2.2. INTRODUÇÃO	34
2.3. METODOLOGIA	37
2.4. RESULTADOS	41
2.5. DISCUSSÃO	50
3. CAPÍTULO 2 - Conectividade genética, variação morfológica e conservação de <i>Mugil curema</i> Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) na costa brasileira.	55
3.1. RESUMO	56
3.2. INTRODUÇÃO	57
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	62
<i>Análises moleculares.</i>	<i>63</i>
<i>Análises de morfometria geométrica.</i>	<i>68</i>
3.4. RESULTADOS	72
3.5. DISCUSSÃO	87
<i>Variabilidade genética e o status de conservação de Mugil curema. ...</i>	<i>87</i>
<i>Coesão genético-evolutiva das populações de Mugil curema.</i>	<i>88</i>
<i>Dinâmica evolutiva em Mugil curema como instrumento para uma pesca sustentável da espécie.</i>	<i>92</i>
4. CONCLUSÃO GERAL	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.I. Resultados obtidos da análise de variância molecular (AMOVA), tendo em vista as três estruturas testadas. Em (A) todas as espécies e os exemplares analisados como um único grupo, em (B) as espécies *Mugil platanus* e *M. liza* como um grupo e *M. curema* e *M. hospes* como outro grupo e em (C) *M. hospes* como um grupo e todos os exemplares das populações de *M. curema* analisados como o outro grupo. 49

TABELA 3.I. Primers ISSRs testados, suas respectivas sequências e temperatura de anelamento. Primers sublinhando foram os selecionados por apresentarem maior polimorfismo. 66

TABELA 3.II. Primers utilizados nas reações de PCR, com o número de loci encontrados tanto em *M. curema*, assim como nas demais espécies do gênero *Mugil*. Observa-se também os extremos dos tamanhos em pares de base (pb) encontrados em cada primer. 72

TABELA 3.III. Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *M. curema*, em relação ao conjunto total de loci analisados, sendo 30 indivíduos para cada localidade. 74

TABELA 3.IV. Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *M. curema*, em relação ao conjunto total de loci presentes em cada localidade. 74

TABELA 3.V. Valores de distância geográfica (acima da diagonal, em quilômetros) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *M. curema* ao longo da costa brasileira. Em destaque as distâncias genéticas observadas entre a amostra do Canal de Santa Cruz e as demais. Onde: Can/SP = rio Ribeira de Iguape, Cananéia, SP; Pia/AL = rio São Francisco, Piaçabuçu, AL; Tam/PE = rio Formoso, Tamandaré, PE; Ita/PE = Canal de Santa Cruz, Ilha de Itamaracá, PE; Cab/PB = rio Paraíba do Norte, Cabedelo, PB e Nata/RN = rio Potengi, Natal, RN. 75

TABELA 3.VI. Análise de variância molecular para as espécies de *Mugil* em um único grupo. 80

TABELA 3.VII. Análise de variância molecular para as espécies de *Mugil* divididas em dois grupos. Grupo 1: *M. curema*; Grupo 2: *M. hospes*, *M. liza* e *M. platanus*. 80

TABELA 3.VIII. Análise de variância molecular para as populações de *Mugil curema* em um único grupo. 80

TABELA 3.IX. Valores de G_{ST} (acima da diagonal) e N_m (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas das seis localidades de *M. curema* e das demais três espécies de *Mugil* analisadas. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto. **82**

TABELA 3.X. T Resultado do teste de repetibilidade das coordenadas cartesianas dos 17 LMs. **83**

TABELA 3.XI. ANOVA do tamanho do centróide entre as populações de *Mugil curema* coletadas ao longo da costa do Brasil. Para siglas consulte a Tabela V e o texto. **86**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.01. Ciclo de vida típico dos Mugilideos estuarinos. Retirado de Whitfield <i>et al.</i> (2012).	20
FIGURA 1.02. Esquema do ciclo de vida da tainha, <i>Mugil curema</i>	21
FIGURA 1.03. Exemplar de <i>Mugil curema</i> . Foto: Randall, J.E.	23
FIGURA 2.01. Mapa com as localidades de amostragens de <i>Mugil curema</i> , <i>M. platanus</i> , <i>M. liza</i> e <i>M. hospes</i>	38
FIGURA 2.02. Diagrama representativo das bandas encontradas nos géis de agarose das sete enzimas de restrição utilizadas. Onde: PM = Peso molecular padrão, CP = Controle positivo (PCR do COI), pb = pares de base, Números Romanos representam os cinco haplótipos encontrados (vide texto). As diferentes cores representam a presença da banda de cada haplótipo. Destacadas em cinza representam as enzimas não informativas.	43
FIGURA 2.03. Mapa com localização das amostras de <i>M. curema</i> , com a distribuição em cada localidade dos haplótipos encontrados de cada espécie. As diferentes cores indicam os diferentes haplótipos.	44
FIGURA 2.04. Topologia de <i>Neighbor-joining</i> obtida à partir dos dados dos perfis PCR-RFLPs do COI. Os valores abaixo dos ramos são respectivamente aqueles de <i>Bootstrap</i> e <i>jackknife</i> . As chaves agrupam os haplótipos.	46
FIGURA 2.05. Topologia de Máxima Parcimônia obtida à partir dos dados dos perfis PCR-RFLPs do COI. Os valores abaixo dos ramos são respectivamente aqueles de bootstrap e jackknife. As chaves agrupam os haplótipos.	47
FIGURA 3.01. Mapa com as localidades de amostragens de <i>Mugil curema</i> , <i>M. platanus</i> , <i>M. liza</i> e <i>M. hospes</i>	63
FIGURA 3.02. Exemplares das espécies do gênero <i>Mugil</i>	64
FIGURA 3.03. Lectótipo de <i>Mugil curema</i> (sintipo). MNHN A-3638. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, França. Foto: Ferrara, C. 2005.	69
FIGURA 3.04. Desenho esquemático de <i>Mugil</i> com a indicação do local de digitalização dos 17 LMs nas imagens dos peixes coletados.	69

- FIGURA 3.05.** Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de *ISSR 16*) exemplificando os perfis *ISSRs* e o polimorfismo das bandas em *M. curema*. Nota: Primeira banda representa o peso molecular padrão (*Ladder*). 73
- FIGURA 3.06.** Topologia de *Neighbor Joinning* obtida entre os exemplares de *M. curema* oriundos das localidades amostradas. Nota: As diferentes cores indicam as localidades. Os valores de *bootstrap* e *jackknife* encontram-se indicados nos ramos. Para siglas consulte a Tabela V e o texto. 76
- FIGURA 3.07.** Regressão entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas (km) para as amostras das seis localidades de *Mugil curema* estudadas. 77
- FIGURA 3.08.** Topologia de máxima parcimônia obtida entre os exemplares de *M. curema*. Nota: As diferentes cores indicam a localidade dos espécimes. Os valores de *bootstrap* e *jackknife* encontram-se indicados nos ramos. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto. 78
- FIGURA 3.09.** Estruturação bayesiana mostrando a existência de três populações ($K = 3$) para as amostras das seis localidades de *Mugil curema* estudadas. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto. 79
- FIGURA 3.10.** Gráficos das variáveis canônicas para os indivíduos do gênero *Mugil*. A Esquerda grades de deformação das espécies do gênero, do indivíduo consenso e do Lectótipo de *Mugil curema*, todos pela variável canônica 1. 84
- FIGURA 3.11.** Gráficos das variáveis canônicas para os indivíduos das seis populações de *Mugil curema*. As grades de deformação das populações, do indivíduo consenso e do Lectótipo de *M. curema*, todos pela variável canônica 1. 85

RESUMO

Os padrões de estruturação populacional podem ser entendidos pela dinâmica das populações, e tal entendimento passa pela distinção de unidades evolutivas e compreensão dos padrões de conectividade. A tainha (parati), *Mugil curema*, objeto do presente trabalho, apresenta-se como modelo para estudos de conectividade populacional, uma vez que existem evidências consolidadas acerca da existência de um potencial complexo de espécies ou de populações disjuntas. Revelar o patamar de variação genética-morfológica da espécie, bem como descobrir como e em que nível a variabilidade genética se apresenta ao longo da região é o objetivo central do presente estudo. A espécie foi estudada nos estuários dos rios Potengi/RN, Paraíba do Norte/PB, Canal de Santa Cruz/PE, Formoso/PE, São Francisco/AL e Ribeira de Iguape/SP. A variabilidade genética foi acessada por PCR, pelo uso de marcadores moleculares PCR-RFLP do gene Citocromo Oxidase Subunidade I e ISSRs, foram observadas as histórias genético-demográfica da espécie na região, sendo desenvolvidas análises de agrupamento e mensurados parâmetros genético-populacionais. A diferenciação em tamanho e forma dos indivíduos foi realizada pela morfometria geométrica. Tanto os dados obtidos da região mitocondrial, assim como os colhidos da região nuclear do genoma da espécie evidenciaram alto grau de estruturação populacional. Em menor grau, mas também evidente, foi observada diferenciação morfológica entre os exemplares dos diferentes estuários. Pode-se concluir que as populações de *Mugil curema* encontram-se em processo de diversificação, sugerindo um possível complexo de espécies sob a denominação *Mugil curema*. Além disso, uma das populações deste complexo é genético-evolutivamente mais relacionada com *Mugil hospes* do que com duas outras populações da própria espécie. Perante os resultados obtidos, o manejo das

populações de *Mugil curema* no litoral brasileiro deve ser abordado de forma muito cuidadosa e específica, uma vez que a diversificação populacional deste taxon é conspícua e de forma geral é notório que os seis estuários não podem ser regidos pelas mesmas ações e medidas para a conservação do estoque de tainhas.

PALAVRAS-CHAVES: COI, mtDNA, ISSR, Morfometria geométrica, Estruturação genética, Filopatria, Atlântico Sul, Tainha/Parati

ABSTRACT

Patterns of population structure can be understood by the population dynamics, and this knowledge involves the distinction of evolutionary units and understanding patterns of connectivity. The white mullet, *Mugil curema*, the aim of this work is a model for studies of population connectivity, since there is evidence about the potential existence of a species complex or disjunct populations. The purpose of the present study is to evaluate the level of genetic and morphological variation among populations of this specie, as well as to discover how and at what level the genetic variability appears throughout the region. White mullet was sampled in the estuaries of rivers Potengi/RN, Paraíba do Norte/PB, Canal de Santa Cruz/PE, Formoso/PE, São Francisco/AL and Ribeira do Iguape/SP. Genetic variability was assessed through PCR, using molecular markers PCR-RFLP from Cytochrome Oxidase subunit I gene and ISSRs markers, showed the genetic and demographic histories of species in the region, cluster analysis were made and genetic population parameters measured. The difference in size and shape of individuals was performed by geometric morphometrics. The data obtained from the mitochondrial region as well as nuclear genome showed a high degree of population structure. Also evident, morphological differentiation was observed between specimens of different estuaries. In conclusion, populations of *Mugil curema* are in the process of diversification, suggesting a possible species complex under the same taxon name. Furthermore, one populations from this complex is genetic evolutionarily most closely related to *Mugil hospes* than with the others populations of the species itself. Given these results, the management of populations of *Mugil curema* in the Brazilian coast should be handled carefully, since the population of this taxon diversification is conspicuous. Is known that

white mullet from these six estuaries should not be managed by the same programs and measures for conservation.

KEYWORDS: COI, mtDNA, ISSR, Geometric Morphometric, Genetic Structuring, Philopatry/Homing, South Atlantic, White Mullet.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O planejamento para a conservação de recursos renováveis como os estoques pesqueiros, que são uma unidade administrativa e não biológica, passa pela identificação correta de suas unidades evolutivas. Dessa forma é necessário que a cadeia produtiva destine a devida atenção à identificação e preservação de seus recursos biológicos (TORRES, 2003). Entender a dinâmica biológica das populações e espécies marinhas está diretamente relacionado a uma investigação dos princípios e processos que governam a história da biodiversidade.

Distinguir unidades evolutivas advém da compreensão dos padrões de conectividade populacional, uma vez que estudos teóricos sugerem que a conectividade da população tem um papel fundamental na dinâmica local de metapopulações, dinâmica e estrutura da comunidade, diversidade genética, e a resiliência das populações à exploração humana (HASTINGS; HARRISON, 1994;. BOTSFORD *et al.*, 2001). No ambiente marinho, tais questões são entrelaçadas àquelas relacionadas às estratégias de manejo, uma vez que muitas espécies já estão ameaçadas ou sobreexploradas (PALUMBI, 2003). Acredita-se que um dos maiores desafios reside em determinar a origem do recrutamento larval e os locais de assentamento dessas larvas (PINEDA *et al.*, 2007), porém a extensão marinha e sua aparente homogeneidade, torna a questão difícil de ser resolvida (KINLAN; GAINES, 2003; SHANKS *et al.*, 2003). Com essa potencial homogeneidade poderia se esperar que as populações de peixes exibissem pequenas taxas de mudanças evolutivas (HAUSER; CARVALHO, 2008). Todavia, uma nova visão de que os padrões de conectividade não são somente governados pela dispersão larval vem de encontro a esse paradigma, reavaliando a conectividade entre

populações marinhas (COWEN *et al.*, 2006, 2007; TREML *et al.*, 2008; COWEN; SPOUNGALE, 2009).

Nesse contexto, é vital compreender os padrões espaciais e evolutivos da estruturação das populações, principalmente quando se refere à conservação das espécies exploráveis, visando estratégias de manejo. Tais estratégias devem objetivar a conservação da biodiversidade, que envolve não apenas a riqueza de espécies, mas também a variação genética intraespecífica, necessária à adaptação e persistência nos ecossistemas (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007).

Potencial pesqueiro de Mugil curema Valenciennes, 1836.

A família Mugilidae é composta por 17 gêneros e 72 espécies, com ampla distribuição geográfica no mundo (NELSON, 2006). Com uma morfologia externa muito conservada, sua taxonomia tem sido muito debatida, sendo bastante problemática (THOMSON, 1978; MENEZES *et al.*, 2010). Seus representantes ocorrem em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo, habitando preferencialmente águas estuarinas e salobras, podendo fazer incursões em águas marinhas e continentais com algumas espécies dulcícolas (THOMSON, 1978; MENEZES; FIGUEIREDO, 1985). São espécies pelágicas costeiras, de águas rasas, nadando em cardumes perto da superfície (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985). De maneira geral o ciclo reprodutivo das espécies marinhas/estuarinas é composto por uma fase de maturação gonadal nos estuários. Após essa etapa segue um período de migração reprodutiva em alto mar (BIZERRIL; COSTA, 2001). Depois da metamorfose, os jovens buscam águas costeiras, adentrando ativamente nos estuários onde se desenvolvem e à

medida que crescem realizam a migração reprodutiva (VIEIRA; SCALABRIN, 1991) (Figura 1.01). De maneira similar se comporta a tainha, *Mugil curema*, sendo que seus ovos demoram cerca de 3 semana para eclodir e possuem uma fase larval que pode durar até 3 meses (ANDRESON, 1957) (Figura 1.02).

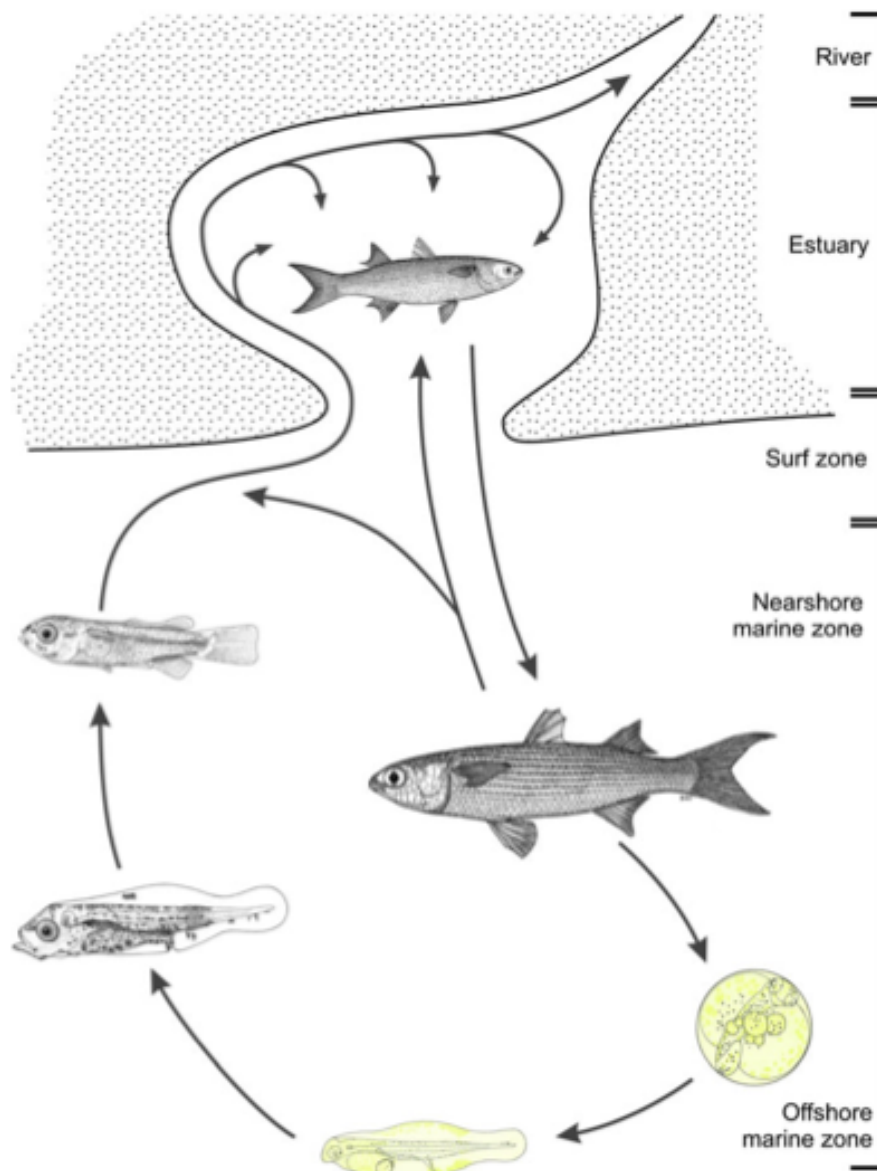


FIGURA 1.01. Ciclo de vida típico dos Mugilideos estuarinos.
Fonte: Whitfield *et al.* (2012).

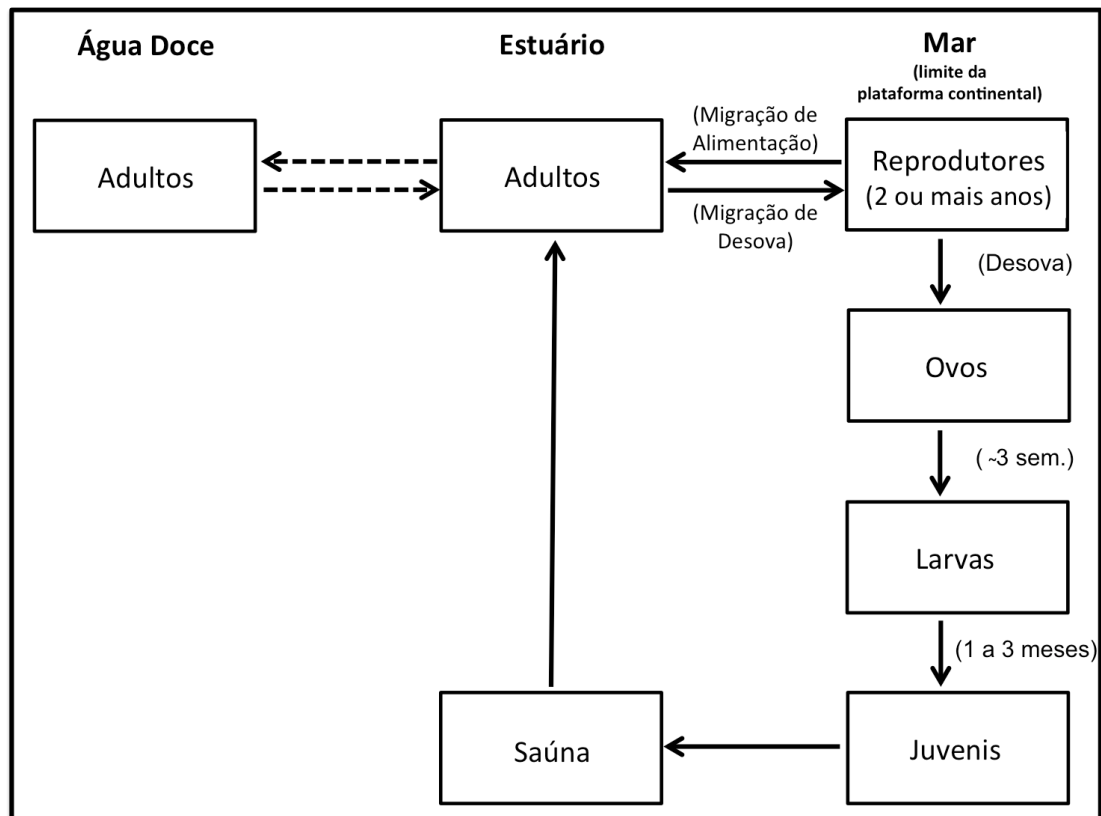


FIGURA 1.02. Esquema do ciclo de vida da tainha, *Mugil curema*.

No Brasil esses peixes são conhecidos popularmente como tainhas, saúnas (juvenis) e paratis. É uma das famílias mais exploradas pela pesca artesanal em toda a costa brasileira (PAIVA, 1997). Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*) a pesca dos mugilídeos no Brasil, apresentou um aumento relevante em suas capturas até 1976 (ALARCÓN, 2002). No final dos anos 70 a produção de espécies dessa família decresceu até 1988, e manteve-se sem grandes alterações em suas capturas até os dias de hoje (FAO, 2011), ressaltando, entretanto, que esses dados em sua maioria referem-se à pesca de *Mugil platanus*, capturado principalmente no Sul e Sudeste do Brasil. Diferentemente do restante do Brasil, *Mugil curema* nos últimos anos este recurso pesqueiro no litoral Nordeste do Brasil apresenta uma tendência de crescimento de

pesca (LESSA *et al.*, 2006). Só em 2004 a região Nordeste apresentou em 2004 uma captura total de tainhas de 7.628,00 toneladas (FUNDAÇÃO PROZEE, 2006). Em Pernambuco, entre os anos de 1993 até 2005 a produção de tainha aumentou quase 7 vezes, sobretudo pelo aumento do esforço de pesca e da pesca da saúna (nome popular dado os juvenis) (SILVA, 2007). A pesca da espécie é tradicional e artesanal em quase toda a costa brasileira, (MENEZES & FIGUEIREDO, 1985) e historicamente nota-se também a importância deste recurso por populações indígenas desde períodos pré-lineanos (MARCGRAF, 1648), até a era contemporânea como pode-se observar pela seguinte passagem: “[...] a tainha quer no litoral de todo o Brasil como nos Estados Unidos e na Europa tem grande importância econômica, não tanto pela qualidade, que é inferior, mas pela quantidade que é pescada [...]” (IHERING, 1940).

Conhecido no Nordeste no Brasil por tainha e no Sul e Sudeste como parati, *Mugil curema* (em inglês: *white mullet*), o objeto da presente tese (FIGURA 1.03), possui o corpo prateado e mais escuro na parte superior. As nadadeiras são levemente amareladas. A segunda dorsal tem a ponta levemente enegrecida e as nadadeiras caudal e peitorais apresentam pigmentação escura esparsa. As peitorais têm uma mancha escura na sua base, mais evidente no lado interno da nadadeira (MENEZES, 1983). A espécie ocorre predominantemente na costa atlântica do continente americano. Se distribui desde Cape Code (EUA) até o litoral da Argentina (THOMSON, 1997; HERAS *et al.*, 2006) e do Golfo da Califórnia, até o norte do Chile no Pacífico (THOMSON, 1997). A espécie também pode ser encontrada na costa da África Ocidental (TRAPE *et al.*, 2009).

Os indivíduos de *Mugil curema*, quando adultos habitam regiões de fundo lodoso e águas turvas, regiões encontradas principalmente nos estuários, os juvenis podem ser encontrados

também em praias arenosas, perto da desembocadura dos rios (FERREIRA, 1989; VIEIRA, 1991; FAVERO, 2011). Em relação à alimentação, *Mugil curema* está adaptado a alimentos de diversas origens, diferenciando seus hábitos alimentares de acordo com a fase de seu ciclo de vida, sendo considerada detritívora, iliófaga, herbívora, onívora, fitófaga e zooplancetófaga (FRANCO & BASHIRULLAH, 1992). Na fase adulta, a espécie é principalmente iliófaga, apresentando itens alimentares pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, como por exemplo, Bacillariophyceae (diatomáceas), Crustacea (copépodos), Dinophyceae (dinoflagelados), algas e Polychaeta (VASCONCELOS-FILHO, 1990).

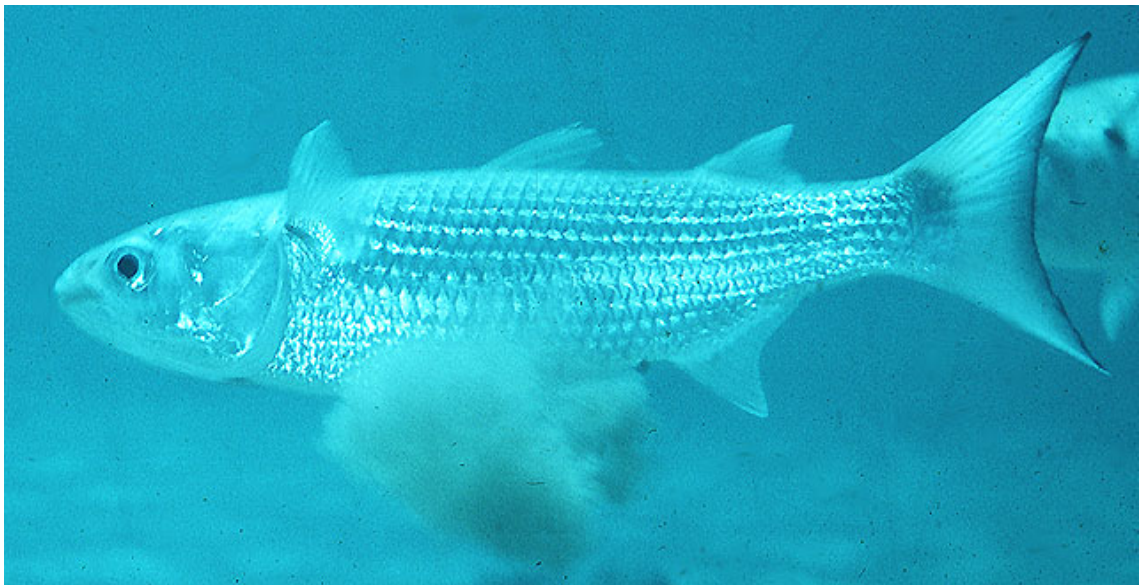


FIGURA 1.03. Exemplar de *Mugil curema*. Foto: Randall, J.E.

Devido a sua ampla distribuição e sua dependência de regiões estuarinas e sua importância ecológica, esta espécie apresenta-se como um interessante modelo para estudos de conectividade genética relativos ao reconhecimento dos limites geográficos de populações e espécies. Existem evidências consolidadas acerca da existência de

um potencial complexo de espécies ou de populações disjuntas, existindo sob uma única designação taxonômica. Tais estudos evidenciaram este fenômeno ao longo de parte da sua distribuição geográfica da espécie, na costa sul-americana, tornando, neste momento a região do Nordeste oriental do Brasil e suas adjacências costeiras como a prioridade de estudos de conexão genética sobre a espécie.

Dados desta espécie referentes ao uso de feições cariotípicas focados na diagnose taxonômica, no teste de monofilia da espécie, bem como na identificação de descontinuidades genéticas populacionais ao longo da sua distribuição geográfica, vêm apontando para a hipótese de unidades biológicas disjuntas. NIRCHIO *et al.* (2003) investigou cariotipicamente amostras de *M. curema* da Venezuela e a espécie caracterizou-se por apresentar $2n = 24$ cromossomos [(22 (M) metacêntricos + 2 (SM) submetacêntricos)]. Já, amostras da espécie oriundas do Golfo de México (Louisiana/EUA) e do mar do Caribe (Venezuela), revelaram uma constituição cariotípica de $2n = 28$ na região Norte-Americana e $2n = 26$ na região Sul-Americana (LEGRANDE; FITZSIMONS, 1976; NIRCHIO; CEQUEA, 1998). Tais evidências podem sugerir a ocorrência de interrupção de fluxo gênico ao longo das regiões estudadas e, portanto, a existência de unidades evolutivamente significativas ou populações isoladas. Abordagens similares têm corroborado à hipótese de descontinuidade populacional *M. curema* ao longo de sua área de ocorrência, dada à conspícua diversidade cariotípica observada entre amostras do Golfo do México, Venezuela e Brasil (litoral do estado do Paraná) (NIRCHIO *et al.*, 2005).

Os estudos com marcadores moleculares, 16S e Citocromo b, têm corroborado as evidências de natureza citogenéticas. Indivíduos oriundos das regiões litorâneas dos estados do Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa

Catarina revelaram dois grupos genéticos descontínuos (FRAGA *et al.*, 2007). Em termos específicos, *M. curema* da costa brasileira e venezuelana constituem populações que evoluíram independentemente, mas indistinguíveis até o momento, sob o ponto de vista morfológico, porém coexistentes ao longo da área acessada (FRAGA *et al.*, 2007).

Um fato interessante a ser destacado é a inexistência de abordagem similares à descrita acima para a região que compreende o presente trabalho (Nordeste oriental do Brasil: Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas/Sergipe). Assim, esta tese tem como objetivo principal verificar o padrão de conectividade genético-morfológica/demográfico deste importante recurso pesqueiro. Para isso, foram utilizados marcadores moleculares mitoncondrias, DNA-Barcode e PCR-RFLP; marcadores moleculares nucleares, ISSR; e morfometria geométrica, metodologias já consolidadas nestas questões.

Dessa forma, é algo proeminentemente importante revelar o patamar de variação genético-morfológica da espécie, bem como descobrir como (modelo espacial) e em que nível (quanto) a variabilidade genética de *M. curema* se apresenta ao longo da região proposta para o presente estudo. Tal consideração se sustenta no incremento das pescarias de tainha e no impacto socioeconômico que a espécie detém na região, se constituindo como um recurso explorado ao longo de todo ano pelas comunidades pesqueiras mais carentes, ou seja, aquelas tradicionalmente artesanais. Nesse sentido, gerar dados que auxiliem, orientem ou indiquem procedimentos de sustentabilidade de recursos pesqueiros, com impactos sociais similares ao apresentado por *M. curema*, deve ser foco das pesquisas em biologia pesqueira.

DNA Barcoding.

As mitocôndrias possuem um genoma próprio, a DNA mitocondrial (mtDNA), é formado por uma molécula de fita dupla circular, sendo muito utilizada para estudos evolutivos e populacionais por apresentar herança uniparental materna, não seguindo os padrões de segregação mendelianos e não sofrendo recombinações. Possui como uma das principais característica alta taxa evolutiva em comparação ao DNA nuclear, que possui sistema de reparo, mais eficiente que na duplicação do mtDNA (CALCAGNOTTO, 2001; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Os genes encontrados nas mitocôndrias possuem maior variabilidade quando comparado com genes encontrados em regiões nucleares dos eucariotos, por isso, são melhores para pesquisas de cunho populacional e para distinguir espécies próximas. Geralmente, a análise entre sequências de genes mitocondriais são mais simples, por não apresentarem inserções e deleções, que são frequentes em genes ribossomais (FOLMER *et al.*, 1994). Sendo assim, recentemente foi proposto um segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I (COI ou Cox1). De acordo com Hebert *et al.* (2003a; 2003b) esse fragmento seria suficiente, em muitos metazoários, para distinguir e identificar grupos que possuem classificação incerta, além de alocar os espécimes em categorias taxonômicas. Dentre as diversas aplicações para o uso do DNA Barcode podem ser citadas como vantagens a identificação de espécimes imaturos, espécies extintas, indivíduos em diferentes estágios do ciclo de vida e possíveis espécies crípticas e distinções até níveis populacionais (HEBERT *et al.*, 2003a; HUBERT *et al.*, 2008; WARD *et al.*, 2005; IVANOVA *et al.*, 2007).

A região mitocondrial Citocromo c Oxidase I, possui características consideradas convenientes para o seu uso por ser uma região curta e poder ser obtida facilmente para um grande número de táxons com uma pequena quantidade de *primers*. Também é uma sequência de alinhamento fácil e ainda informativa para distinguir populações e espécies próximas, pois possui variabilidade semelhante a outros genes codificadores de proteínas (HEBERT *et al.*, 2003a). Esse gene é o principal gene da metodologia denominada “DNA barcoding”, e tem no “*Consortium for the BarCode of Life (CBOL)*”, criado em 2004, o objetivo de formar alianças internacionais de investigação da diversidade da vida eucariótica (MARSHALL, 2005), por meio da criação de um banco de dados de sequências parciais de DNA do gene COI, promovendo deste modo o processo de automação de identificação das espécies. Diversos consórcios semelhantes foram formados para auxiliar no estabelecimento do CBOL, dentre estes “*The Fish Barcode of Life Initiative (Fish-Bol)*” é uma biblioteca eletrônica de referência que contém sequências de COI de peixes, tanto de água doce quanto marinhos.

Conforme Hajibabaei *et al.* (2007) o DNA *Barcode* auxilia em outros estudos como na filogenia, taxonomia e na genética de populações. Neste último pode oferecer um sinal de divergências populacionais e facilitar o estudo de diversidade populacional. Já segundo Stoeckle *et al.* (2005) existe uma série de obstáculos para a aplicação do DNA *Barcode* como: (a) grupos taxonômicos com baixa diversidade gênica entre suas sequências; (b) espécies que divergiram muito recentemente; (c) possível detecção de híbridos; (d) pseudogenes nucleares (cópias inativas semelhantes ou idênticas de genes em regiões nucleares). Algumas críticas foram feitas em relação à metodologia de DNA *Barcode*. Lipscomb *et al.* (2003) sugere que o DNA Barcode reduziria a identificação taxonômica a uma tarefa meramente técnica ao invés de gerar ciência baseada em hipóteses.

Entretanto a proposta do DNA Barcode é unir pesquisas moleculares e morfológicas para o aprimoramento do processo de identificação e diferenciação de espécies e até de populações (DESALLE *et al.*, 2005).

Os conjuntos de dados moleculares auxiliam principalmente em casos onde as características morfológicas não permitem esclarecer relações a respeito da taxonomia, propiciando assim a elaboração de hipóteses mais consistentes.

PCR-RFLP.

As enzimas de restrição foram descobertas no final da década de 1960, propiciando assim o desenvolvimento da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica surgiu como um marcador amplamente utilizado em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais (FRANCISCO, 2002, LOWE *et al.*, 2004). O polimorfismo em comprimento dos fragmentos obtidos por corte do DNA pelas enzimas de restrição, é o objetivo do RFLP (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

São diversas as aplicações do RFLP, entre elas: estimativa da diversidade genética e estruturação de populações, ocorrência de fluxo gênico, investigação de hibridização, introgressão, autoploidia e alopoliploidia, além de técnicas forenses (LOWE *et al.*, 2004). Como vantagens do RFLP em relação a outros marcadores morfológicos, citológicos ou de isoenzimas, pode-se destacar: obtenção em número elevado; distribuição aleatória no genoma; não são afetados pelo ambiente (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). A detecção de polimorfismos por meio da técnica de PCR- RFLP é

utilizada para a avaliação de diversidade e estruturação genética de populações (LOWE *et al.*, 2004).

Marcadores ISSR.

Em genomas eucariotos, existem diversas sequências simples repetidas, consistidas por um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, denominadas de microssatélites, SSR ou STR (Short Tandem Repeats). Essas repetições de microssatélites são classificadas como: repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes, podendo ser perfeitas ou imperfeitas (REDDY *et al.*, 2002; BORÉM; CAIXETA, 2006).

Os ISSR (*inter simple sequence repeat*) são uma classe de marcadores moleculares gerados por PCR. Consistem em sequências de DNA amplificadas entre dois microssatélites, orientados em direções opostas. Esses marcadores são utilizados desde a década de 1990 como fonte de polimorfismo na identificação de genótipos, confecção de mapas genéticos, seleção assistida em programas de melhoramento, além de estudos filogenéticos e de genética de populações, avaliação e conservação de germoplasma (GUPTA *et al.*, 1994; ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; PARSONS *et al.*, 1997; AJIBADE *et al.*, 2000; RAINA *et al.*, 200; ARCHAK *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2005).

Os microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) mais comumente usados como *primers* são seqüências repetitivas de di, tri ou tetranucleotídeos, dispersas ao longo do genoma. Esses *primers*,

normalmente entre 16 e 25 pares de bases, podem ser ancorados nas extremidades 5' ou 3', com um a quatro oligos degenerados, ou ainda ser não ancorados. As principais vantagens em sua utilização técnica são fácil aplicação, especialmente por não requerer conhecimento prévio sobre a sequência de DNA; o alto grau de polimorfismo gerado, o uso de pequenas quantidades de DNA por reação, a especificidade e a reprodutibilidade devido ao tamanho relativamente grande dos *primers*. Um aspecto não vantajoso seria o fato de ser um marcador dominante, e, por não distinguir homozigotos e heterozigotos, não seria tão informativo quanto os SSR, por exemplo.

Morfometria Geométrica.

A morfometria é o estudo estatístico das mudanças e variações no tamanho e na forma, ou a mensuração e avaliação de um componente complexo e multidimensional como a forma (MONTEIRO; REIS, 1999; MORAES, 2003). Existem duas linhas principais nessa disciplina, a morfometria tradicional e morfometria geométrica.

A morfometria tradicional, é o estudo da variação e covariação de medidas de distâncias entre pares de pontos, geralmente comprimentos e larguras de estruturas e, as vezes, proporções também são utilizados (ROHLF; MARCUS, 1993; MORAES, 2003).

A morfometria geométrica, metodologia mais recente, compreende diversas técnicas para descrever e representar a geometria das formas analisadas. É possível descrever e localizar com maior clareza regiões de mudanças na forma, e de reconstituir e reconstruir graficamente tais mudanças. Esta descrição pode ser feita

pelo estabelecimento de pontos anatômicos de referência em estruturas homólogas (marcos anatômicos). Os pontos anatômicos são obtidos levando-se em consideração os objetivos do estudo, como (1) características funcionais; (2) características sistemáticas; (3) características de desenvolvimento ou, de maneira geral, (4) tamanho e forma (ZELDITCH *et al.*, 2004). As coordenadas cartesianas destes pontos, em duas ou três dimensões, são as variáveis que informarão a geometria das estruturas estudadas. A vantagem dessa metodologia, é que estas incluem informações sobre suas posições relativas, e assim, permitem a reconstrução da forma após as diversas análises uni – e multivariadas. Além disso, a morfometria geométrica permite detectar com precisão a localizar mudanças da forma através do deslocamento de certos pontos em relação a outros, permitindo a observação das diferenças na forma (MORAES, 2004). A morfometria geométrica é mais robusta na análise integrada e exclui fatores de posição, orientação e tamanho na análise das formas (MONTEIRO; REIS, 1999; MORAES, 2003). Apenas no início dos anos noventa do século XX, a morfometria geométrica tornou-se mais largamente utilizada, possibilitando os pesquisadores em morfologia quantitativa por métodos que juntassem o caráter geométrico das formas e a possibilidade de um tratamento estatístico da variação, permitindo assim, resultado da mais robustos (MONTEIRO; REIS, 1999).

2. CAPÍTULO 1

Relações genético-evolutivas de *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) e entre espécies co-genéricas na costa brasileira.

Gondolo, G. F.*^{1,2,3}; Santos, F. A.²; Santana, R. S.⁴, & Torres, R. A.^{2,3}

1. Laboratório de Ictiologia, Universidade Estadual do Piauí, *Campus* Heróis do Jenipapo. Av. Sto. Antônio s/n, São Luís, Campo Maior/PI, Brazil. CEP: 64.280-000.

2. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes do Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE. Brazil. CEP: 50.670-420.

3. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes do Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE. Brazil. CEP: 50.670-420.

4. Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela. Bloco 16, Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550.

*Autor para correspondência. e-mail: guilherme.gondolo@uespi.br

2.1. RESUMO

Identificar descontinuidades genético-evolutivas, através de informações obtidas da região *barcode* foi o objetivo deste trabalho, a partir da PCR-RFLP da *citocromo c oxidase I* de *Mugil curema* e outras três espécies co-genéricas amostradas na costa brasileira. Os PCRs geraram fragmentos de aproximadamente 700 pb, que foram digeridos por sete enzimas de restrição. Das informações obtidas pela visualização das bandas nos géis de agarose foi elaborada uma matriz de presença e ausência, que forneceu a possibilidade da identificação de cinco haplótipos. As topologias das análises de agrupamento por *neighbor-joining* e máxima parcimônia foram muito similares entre si e definidas pelos haplótipos encontrados. As relações obtidas sugerem a descontinuidade genético-evolutiva de *M. curema* na região estudada sem um aparente padrão histórico de relacionamento regional. A AMOVA reforçou as topologias obtidas indicando que a maior variância genética encontra-se entre os grupos analisados, gerando um F_{ST} de alta significância em termos evolutivos. Pode-se concluir que as populações de *M. curema* encontram-se em um franco processo de diversificação, sugerindo um possível complexo de espécies sob a denominação *M. curema*. Além disso, uma das populações deste complexo é genético-evolutivamente mais relacionada com *M. hospes* do que com duas outras populações da própria espécie. Além disso, os resultados obtidos ainda sugerem sob uma visão de taxonomia cladística, que *M. platanus* e *M. liza* podem ser consideradas como sinonímia. Perante os resultados obtidos, o manejo das populações de *M. curema* no Nordeste brasileiro deve ser abordado de forma muito cuidadosa e específica, uma vez que a diversificação populacional deste táxon é conspícua.

PALAVRAS-CHAVES: *COI*, mtDNA, Estruturação genética, Atlântico Sul, Tainha/Parati.

2.2. INTRODUÇÃO

A coesão evolutiva das espécies em termos da identificação das populações e unidades de manejo é um dos maiores desafios dos ictiólogos relacionados com recursos pesqueiros. Peixes são frequentemente identificados com base em morfologia externa, entretanto em alguns casos este método pode ser impreciso (TELETCHÉA, 2009).

Os casos de espécies crípticas (CRAIG *et al.*, 2009; TELETCHÉA, 2009; SMITH *et al.*, 2010) ou grupos taxonômicos com caracteres morfológicos extremamente conservados como os Mugilideos (THOMSON, 1997; NELSON, 2006), são exemplos claros destas circunstâncias de imprecisão taxonômica. Em termos conservacionistas, a resolução de incertezas taxonômicas é o primeiro passo e os métodos de acesso à informação genética podem contribuir de forma eficaz (FRANKHAM *et al.*, 2008) no planejamento de conservação das espécies com potencial de exploração. Assim, o uso de outras ferramentas que auxiliem na correta identificação das espécies e de suas populações, como aquelas obtidas a partir do DNA são requisitadas em alguns casos, já que são menos susceptíveis à variação ambiental (CHENG; LU, 2005).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é a mais popular das regiões genômicas acessadas para os fins de conectividade populacional, bem como imprecisões taxonômicas, apesar de representar uma pequena fração do genoma total dos organismos animais (GALTIER *et al.*, 2009). Em termos mais específicos, o gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI), foi eleito como ferramenta padrão para a taxonomia molecular e identificação de espécies (RATNASINGHAM; HEBERT; 2007) e batizado como DNA *barcode* (HEBERT *et al.*, 2003). Em geral, esta região genômica se caracteriza por apresentar a menor

taxa de fixação de mutações não sinônimas, se constituindo portanto, como o gene de evolução mais lenta entre aqueles outros codificantes para polipeptídeos mitocondriais (PESOLE *et al.*, 1999). O COI é compreendido por uma sequência nucleotídica relativamente curta (~1000 pb), mas que permite identificação, distinção e até o reconhecimento de populações evolutivamente descontínuas e de novas espécies (BUCKLIN *et al.*, 2011), favorecendo portanto a observação de fenômenos de especiação críptica (HEBERT *et al.*, 2004).

O método PCR-RFLP é simples, rápido, confiável e de baixo custo (TELETCHER, 2009). Com ampla aplicabilidade, é facilmente replicável, sendo utilizada com sucesso para identificação de espécies animais, vegetais, fungos, bactérias e até mesmo vírus (WOLF *et al.*, 1999; MALVÁREZ; OLIVEIRA, 2003; MCDONALD *et al.*, 2005; TORRES, 2006; KANG *et al.*, 2008; SANTACLARA *et al.*, 2007; SPERGSE; ROSENGARTEN, 2007; FERNANDEZ-TAJES; MÉNDEZ, 2007; SOWMYA *et al.*, 2007). Os procedimentos PCR-RFLPs podem ainda ser úteis para esclarecer a ocorrência de espécies invasoras de peixes (TORRES, 2006), casos de erros de identificação de indivíduos adultos em peixes (SMITH *et al.*, 2010), entre espécies com semelhanças morfológicas que se sobrepõem geograficamente (BEKTAS; BELDUZ, 2009), identificação de híbridos (HASHIMOTO *et al.*, 2010), além de serem amplamente utilizados como técnica forense de identificação de subprodutos animais (ARDURA *et al.*, 2010; REHBEIN, 2010; UNAJAK *et al.*, 2011). Nos últimos anos, este método tem sido também aplicado para o reconhecimento de padrões de conectividade genético-evolutiva em diversos grupos animais (OLIVERIA-NETO *et al.*, 2007; PÉREZ-ENRIQUEZ *et al.*, 2011; SCHUNTER *et al.*, 2011; GARDENER; WESTFALL, 2012).

A *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae), como recurso pesqueiro da região Nordeste do Brasil, mais

especificamente no Estado de Pernambuco, apresentou um crescimento de sete vezes em suas capturas (LESSA *et al.*, 2006). Principalmente pelo aumento do esforço de pesca e da pesca de indivíduos jovens (SILVA, 2007). Combinado a esse crescente esforço pesqueiro existe uma controvérsia biológica, uma vez que ao longo de sua área de ocorrência, esta espécie parece se encontrar em um cenário similar àqueles de forte estruturação populacional, com evidências que sugerem a ocorrência de interrupção de fluxo gênico, como nas abordagens referentes às feições cariotípicas (LEGRANDE; FITZSIMONS, 1976; NIRCHIO; CEQUEA, 1998; NIRCHIO *et al.*, 2003; NIRCHIO *et al.*, 2005; HARRISON *et al.*, 2007) e também com marcadores moleculares (16S, COI, Phenylalanina transfer RNA (Phe), 12S rRNA e cit b) (FRAGA *et al.*, 2007; HERAS *et al.*, 2009; DURAND *et al.*, 2012), demonstram que sob a denominação *Mugil curema*, podem existir populações genéticas distintas e indistinguíveis sob o ponto de vista anatomo-morfológico. Dentro deste contexto o objetivo principal deste trabalho foi prover uma perspectiva de conexão genético-evolutiva de amostras populacionais de *Mugil curema*, oriundas de estuários do Nordeste e do Sudeste do Brasil, a partir dos perfis PCR-RFLP da região *barcode*. Além disso, objetivou-se aumentar a relação de espécies estudadas a fim de verificar o grau de sobreposição evolutiva de *Mugil curema* com outras espécies congêneres.

2.3. METODOLOGIA

Amostras de tecido muscular de trinta indivíduos de *Mugil curema* (cinco espécimes de cada localidade) provenientes dos estuários dos rios Potengi (Natal/RN: 05°45'04.23"S; 35°11'58.42"W), Paraíba do Norte (Cabedelo/PB: 06°58'13.26"S; 34°50'48.21"W), ambos coletados em março de 2009; do canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá/PE: 07°48'51.07"S; 34°51'06.96"W), coletados em janeiro de 2009; do rio Formoso (Tamandaré/PE: 08°41'38.67"S; 35°05'00.07"W), rio São Francisco (Piaçabuçu/AL: 10°29'46.67"S; 36°23'43.59"W), ambos coletados em fevereiro de 2009 e rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP: 25° 00'53.41"S; 47°55'22.29"W), amostrados em outubro de 2010, compuseram a principal unidade amostral. Além destas, três espécimes de *Mugil hospes* Jordan & Culver, 1895 e três de *Mugil platanus* Günther, 1880, foram amostrados também em Cananéia. Um exemplar de *Mugil liza* Valenciennes, 1836, foi obtido no estuário de Cabedelo/PB e outros dois de Maragogi/AL (09°00'25"S; 35°12'30"W) foram também amostrados (FIGURA 2.01). Os indivíduos foram identificados com o auxílio das chaves de identificação de Menezes (1983), Harrison (1995) e Thompson (1997). Todas as amostras foram acondicionadas em etanol 96% e mantidas a -20 °C. O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo modificado de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Espécimes voucher encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e na Coleção Ictiológica da Universidade Federal da Paraíba, sob os seguintes e respectivos números de tombo: MZUSP 100703; MZUSP 100704; MZUSP 100705; UFPB 9089; UFPB 9090; UFPB 9091; UFPB 9092; UFPB 9093; UFPB 9094; UFPB 9095; UFPB 9096.



FIGURA 2.01. Mapa com as localidades de amostragens de *Mugil curema*, *M. platanus*, *M. liza* e *M. hospes*.

A fim de amplificar o gene mitocondrial *COI*, com 648 pb, foram utilizados os primers universais para peixes: *forward* FishF1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTG-GCAC3') e o *reverse* FishR1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3') (WARD *et al.*, 2005). As reações de PCR com 25 µl continham 2,5 µl de 10x PCR *buffer*, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de dNTP mix (10 mM), 0,2 µl de polimerase *Taq* (1 U), 0,26 µl de cada primer (0,01 mM) 4,0 µl de DNA *template* (5 ng/µl) e 16,0 µl de água ultrapura. O programa do termociclador consistiu em um passo inicial de 2 minutos a 95 °C,

seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 minuto a 72 °C, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após tais procedimentos as reações foram mantidas a 4 °C.

As enzimas utilizadas nas reações RFLPs foram: *Alu I* (AG*CT); *Bam HI* (G*GATCC); *Eco RI* (G*AATTC); *Hae III* (GG*CC); *Hha I* (GC*GC); *Mbo I* (GATC*); *Taq ^αI* (T*CGA). As enzimas foram escolhidas, levando em conta a frequência do sítio de restrição, p.ex. a enzima *Alu I* possui um sítio frequente. Já as enzimas *Eco RI* e *Bam HI*, apresentam sítios escassos

As reações de RFLPs foram preparadas seguindo o protocolo do fabricante das enzimas de restrição (*New England BioLabs Inc.*), compreendendo de 5 a 10,0 µl de produto de PCR, 2,0 µl de 10x *buffer* da enzima indicado pelo fabricante, 10 U de enzima e água ultrapura para completar o volume final de 20 µl. Quando necessário, utilizou-se 0,2 µl de 100x *BSA* (albumina bovina sérica), uma vez que permitiam um melhor resultados nas reações. A digestão ocorreu por 1 hora e 30 minutos à temperatura recomendada pelo fabricante para cada enzima (37 ou 65 °C). A visualização dos produtos da digestão foi realizada com 15 µl da reação em gel de agarose a 1,8% com TBE, corado com *GelGreen™* (*Biotium*), excitado com transiluminador UV e fotografado em máquina digital.

Após a inspeção visual das bandas nas imagens dos géis, foi codificada uma matriz de presença e ausência (1 e 0 respectivamente) no *software Nexus Data Editor* (NDE) versão 0.50 (PAGE, 1998). As análises de *Neighbor-Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) foram desenvolvidas por meio do *software Paup* v.4.0 b10 (SWOFFORD, 2000) através da interface gráfica do *PaupUp* (CALENDINI; MARTIN, 2005). A análise de NJ forneceu a distância genética de Nei (NEI, 1972) entre os terminais. A Análise de MP foi realizado através de busca heurística, com os caracteres designados como “não-

ordenados” e com pesos iguais. Ambas as análises foram desenvolvidas usando as espécies *Mugil platanus*, *M. hospes* e *M. liza* como grupos externos. O consenso de maioria foi computado e a robustez da topologia resultante foi avaliada através de análises de *bootstrap* e *jackknife*, com 1000 pseudo-réplicas.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi desenvolvida para testar o suporte estatístico da estruturação da variância genética entre os agrupamentos observados segundo as análises de NJ e MP. Para tal, foi utilizado o software ARLEQUIN 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Nesta análise a matriz de distância entre os pares de genótipos considera a variação total observada como originária de uma única população panmítica (EXCOFFIER *et al.*, 1992). Na AMOVA, ainda pode-se estimar o índice de fixação intraespecífica da diversidade genética (F_{ST}) e o F_{CT} e F_{SC} para avaliar a proporção de variação entre grupos e entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. Neste trabalho foram testados estatisticamente três modelos de estruturas genético-evolutiva: 1. Com todos os indivíduos de todas as quatro espécies como um único grupo; 2. As espécies de *M. liza* e *M. platanus* com um grupo, e *M. curema* e *M. hospes* em um outro grupo; 3. *M. hospes* como um grupo e as populações de *M. curema* em outro grupo.

2.4. RESULTADOS

A espécie alvo, assim como as três espécies usadas como grupo externo tiveram o *citocromo c oxidase I* (*COI*) amplificado, utilizando os primers F1 e R1, gerando um produto com cerca de 650 pb. A partir dos fragmentos gerados pela digestão da região *barcode* nos diferentes exemplares, das diferentes localidades, e pelo uso das diferentes enzimas, foi construída um diagrama que compila todos os padrões de restrição observados (FIGURA 2.02).

As enzimas *Bam* *HI* e *Eco* *RI* geraram apenas uma banda com padrões idênticos para as quatro espécies estudadas. Por outro lado, *Hha* *III* e *Taq* *^αI* produziram no total e respectivamente, três e quatro bandas, formando dois perfis de bandas para cada uma das enzimas (FIGURA 2.02). Estas duas enzimas ainda permitiram identificar padrões diferentes entre os indivíduos de *M. curema* e *M. hospes* em relação aos de *M. liza* e *M. platanus*. As enzimas *Alu* *I*, *Hae* *III* e *Mbo* *I* produziram também dois perfis de bandas distintos para cada uma das enzimas. Assim, o produto amplificado de *COI* foi digerido, no total, por estas enzimas em quatro, duas e novamente em duas bandas visíveis no gel de agarose, respectivamente. O padrão entre *M. liza* e *M. platanus* foi sempre idêntico entre si e, simultaneamente, sempre distinto de *M. hospes*. O perfil das bandas dos indivíduos de *M. curema* ora eram similares ao de *M. hospes*, ora similares ao de *M. liza* e *M. platanus* (FIGURA 2.02).

Reunindo os padrões oriundos das cinco enzimas, que produziram algum padrão de bandas informativo, foi possível reconhecer cinco haplótipos diferentes. Um deles compartilhado por *M. liza* e *M. platanus* (Haplótipo V) e um segundo (Haplótipo II) compartilhado pelos indivíduos de *M. hospes* e quatro indivíduos de *M. curema* (1 de Itamaracá/PE, 1 de Cabedelo/PB e 2 de Natal/RN)

(FIGURA 2.02 e FIGURA 2.03). Destacando apenas os exemplares de *Mugil curema*, os experimentos RFLPs permitiram a identificação de três haplótipos exclusivos (Haplótipos I, II e III - FIGURA 2.03). O Haplótipo I esteve presente em três indivíduos de Natal (RN) e em um de Cabedelo (PB), enquanto o Haplótipo III foi característico de todos os indivíduos de Tamandaré (PE), de três exemplares de Cabedelo (PB) e de dois de Piaçabuçu/AL, ou seja, estes haplótipos foram exclusivos do Nordeste Oriental do Brasil. Um último haplótipo foi identificado, contendo todas as cinco amostras de Cananéia/SP, quatro de Itamaracá/PE e três de Piaçabuçu/AL (Haplótipo IV) (FIGURA 2.02 e 2.03).

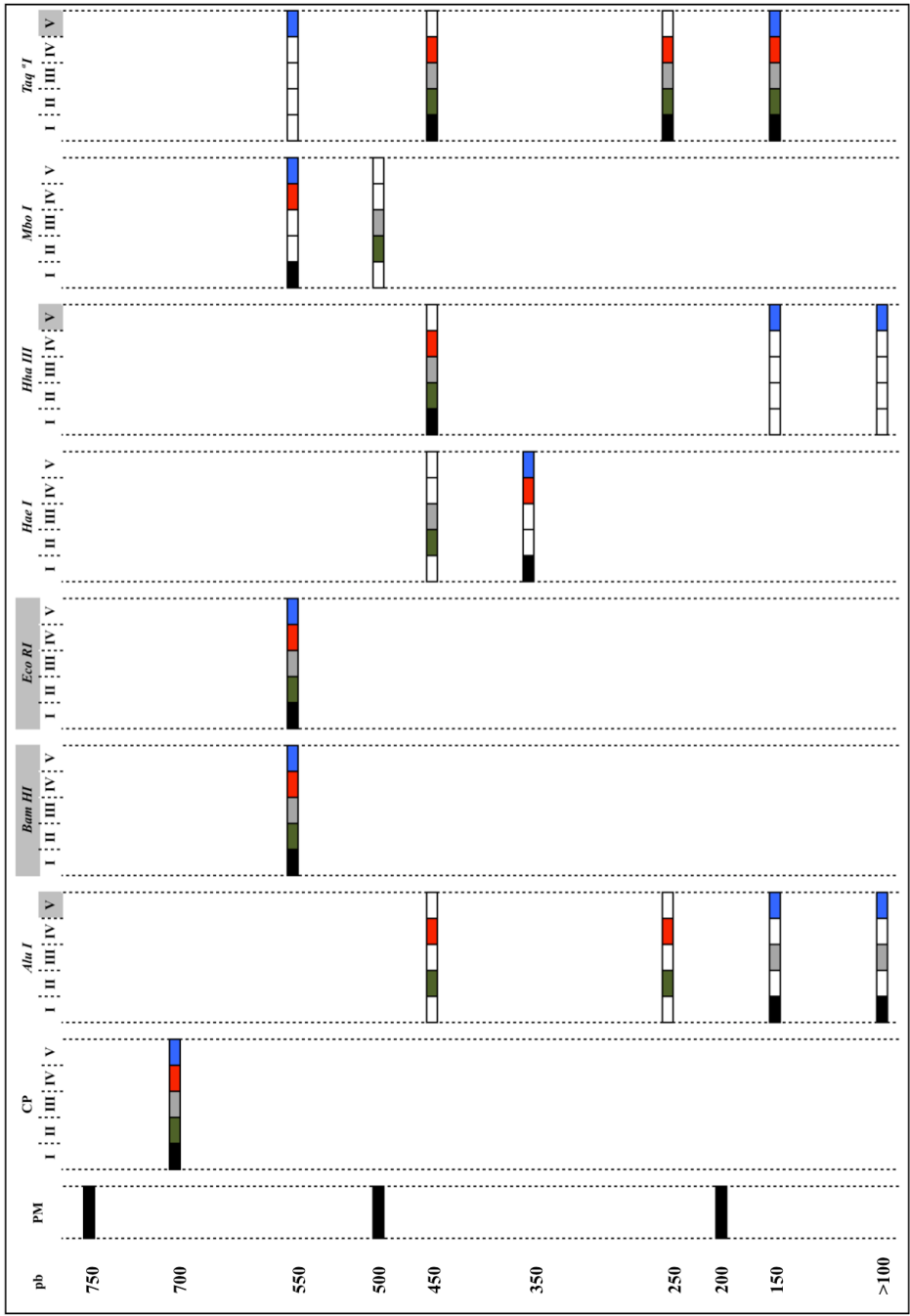


FIGURA 2.02. Diagrama representativo das bandas encontradas nos géis de agarose das sete enzimas de restrição utilizadas. Onde: PM = Peso molecular padrão, CP = Controle positivo (PCR do COI), pb = pares de base, Números Romanos representam os cinco haplótipos encontrados (vide texto). As diferentes cores representam a presença da banda de cada haplótipo. Destacadas em cinza representam as enzimas não informativas.

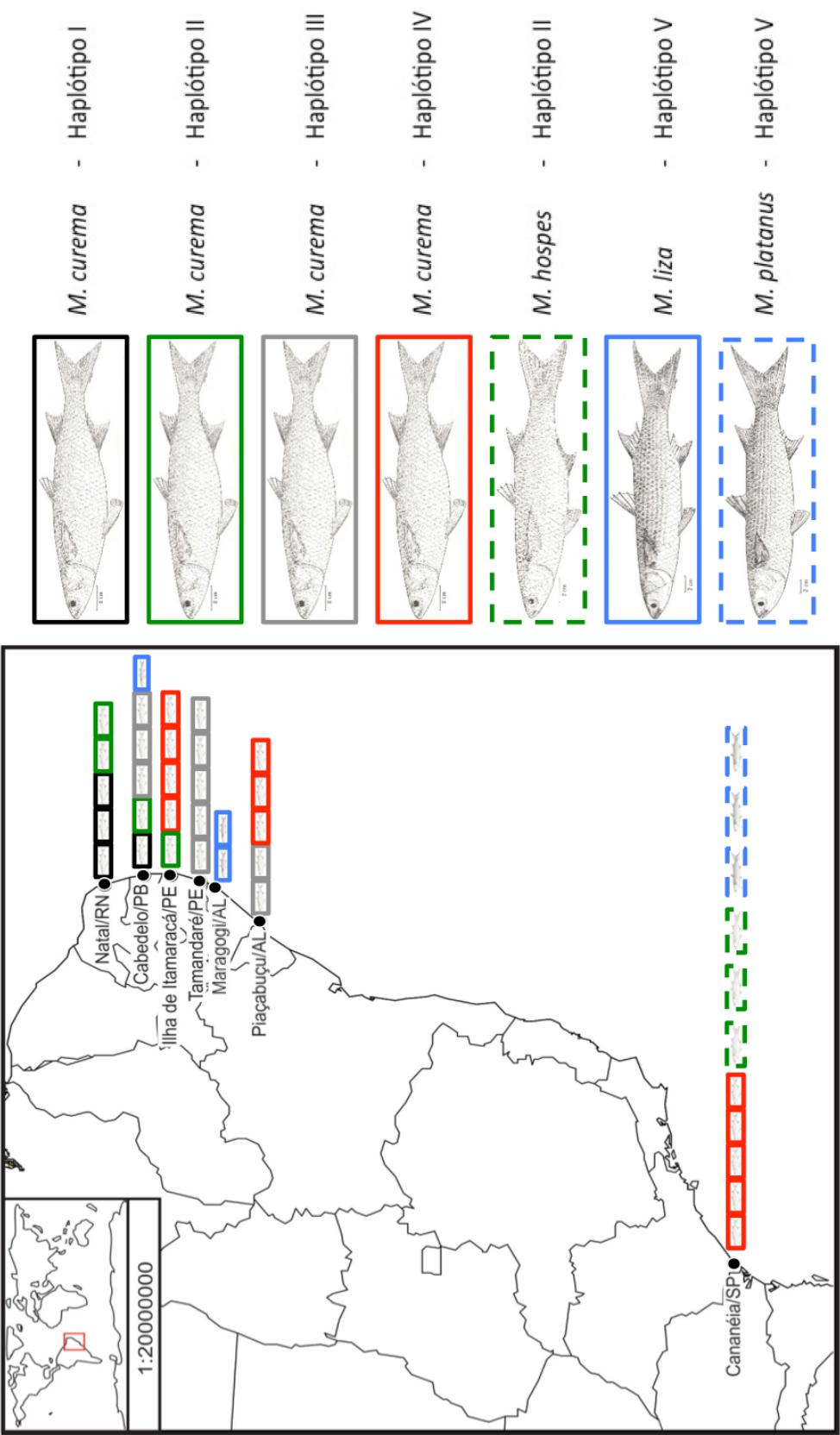


FIGURA 2.03. Mapa com localização das amostras de *M. curema*, com a distribuição em cada localidade dos haplótipos encontrados de cada espécie. As diferentes cores indicam os diferentes haplótipo.

No tocante às análises de agrupamento, as topologias obtidas por *Neighbor-Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) foram muito similares (FIGURAS 2.04 e 2.05). A análise de NJ revelou cinco agrupamentos, que mostram-se satisfatório ou fortemente suportados por valores de *bootstrap* e *jackknife* que variavam de 69/55 a 100/99 (FIGURA 2.04). Já na análise de MP foram observados três agrupamentos cujos valores de suporte variaram de 51/51 a 100/98 (FIGURA 2.05). Assim como na inspeção visual do padrão de bandas (FIGURA 2.02) as análises de NJ e MP (FIGURA 2.04 e 2.05) possibilitaram identificar os mesmos cinco haplótipos, apesar do NJ fornecer cinco agrupamentos e a MP apenas 3. No grupo externo, foi observado um grupo formado pelas espécies *M. liza* e *M. platanus* (Haplótipo V). Mais internamente, em ambas as topologias, foi possível verificar que os três espécimes de Natal e um de Cabedelo formaram um segundo grupo (Haplótipo I). Três espécimes de Cabedelo, todos os cinco de Tamandaré e dois de Piaçabuçu formaram o terceiro grupo nomeado de Haplótipo III. Mais internamente nas topologias foram observados dois grupos mais proximamente relacionados. Um deles formado por quatro indivíduos de Itamaracá, três de Piaçabuçu e todos os cinco de Cananéia (Haplótipo IV), e o outro grupo compreendido por dois exemplares de Natal, um de Cabedelo e outro de Itamaracá, e todos os três peixes de *M. hospes* provenientes de Cananéia.

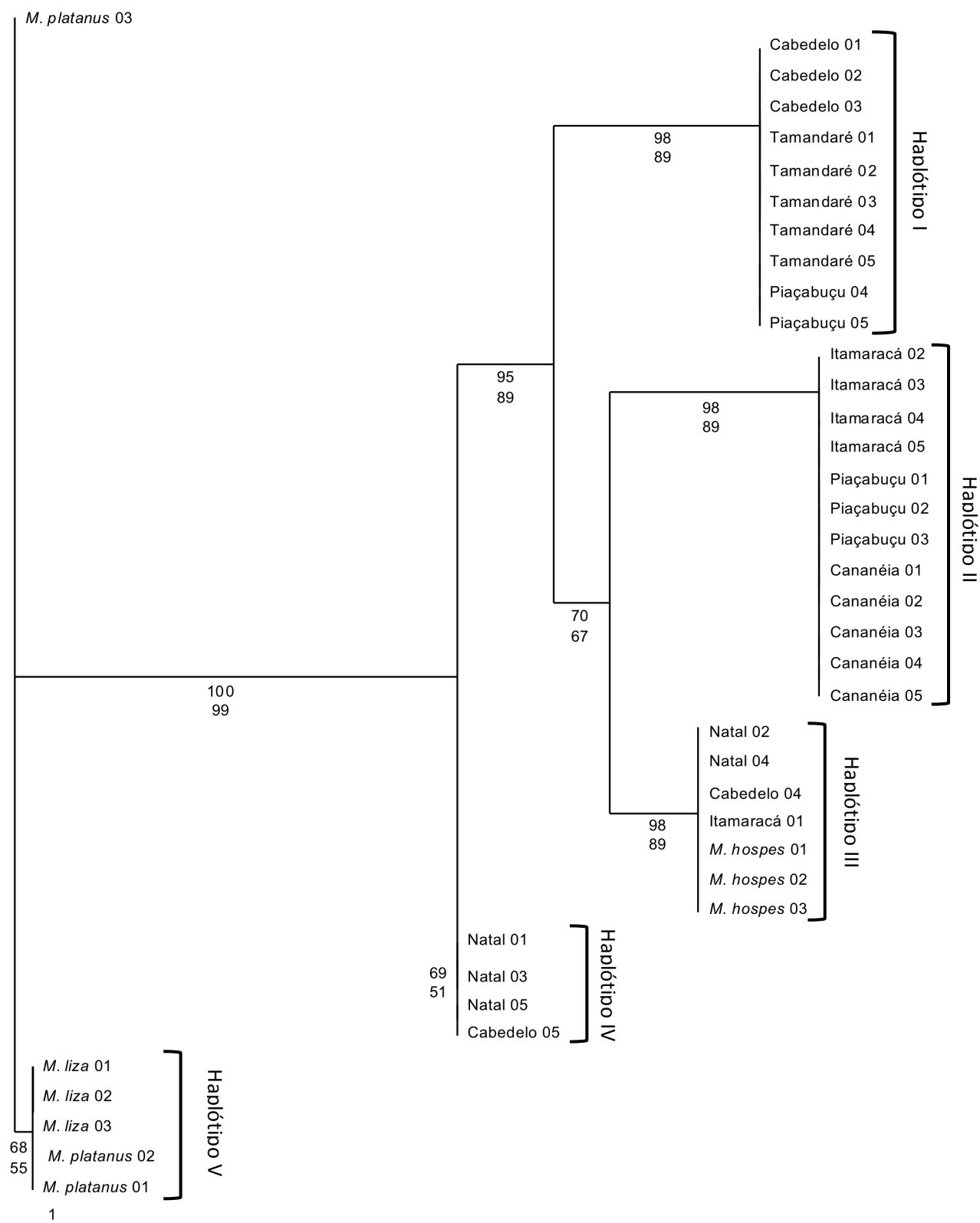


FIGURA 2.04. Topologia de *Neighbor-joining* obtida à partir dos dados dos perfis PCR-RFLPs do *COI*. Os valores abaixo dos ramos são respectivamente aqueles de *Bootstrap* e *jackknife*. As chaves agrupam os haplótipos.

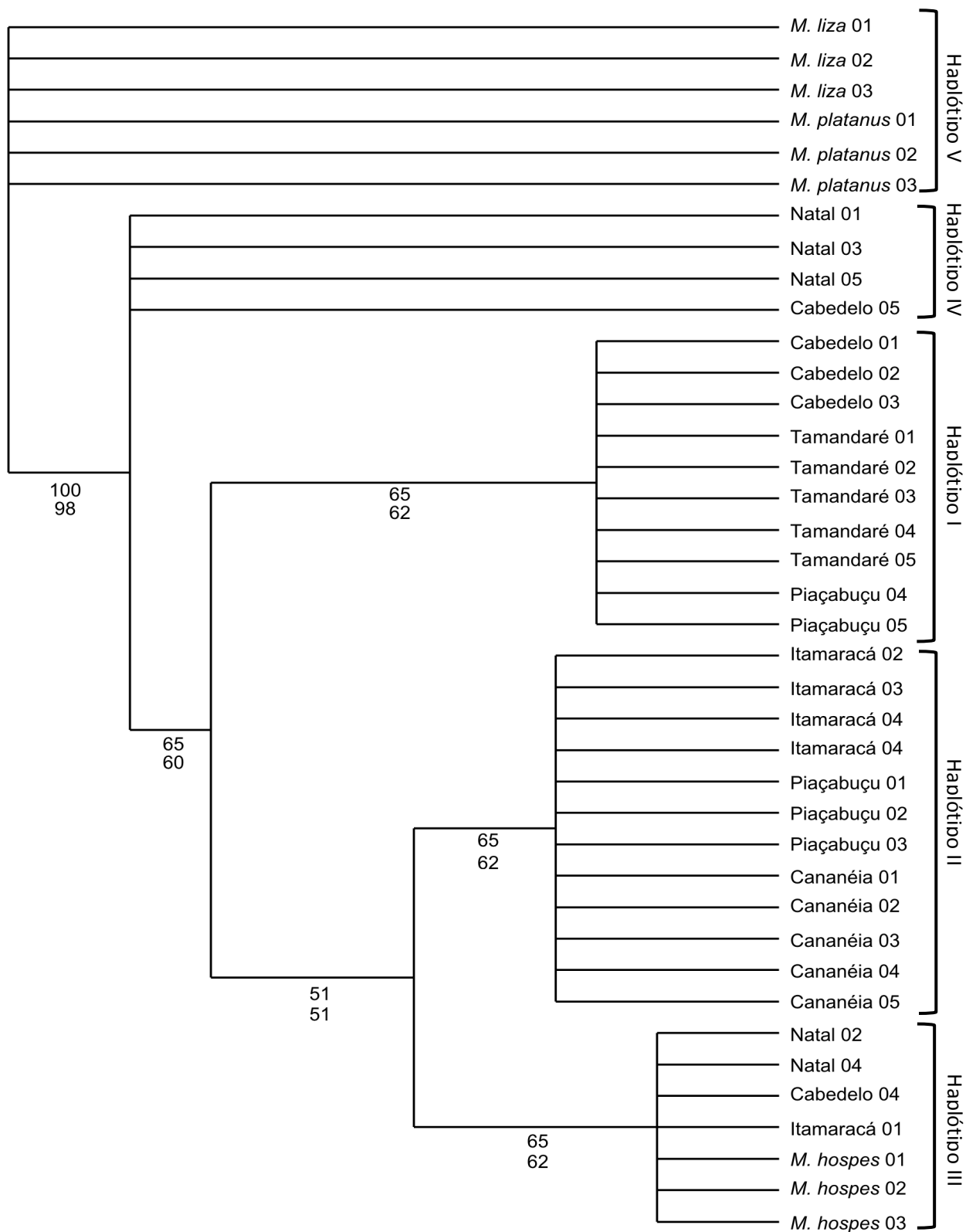


FIGURA 2.05. Topologia de Máxima Parcimônia obtida à partir dos dados dos perfis PCR-RFLPs do COI. Os valores abaixo dos ramos são respectivamente aqueles de bootstrap e jackknife. As chaves agrupam os haplótipos.

No que se refere à AMOVA (TABELA 2.I), a análise da estrutura para todos os exemplares como um único grupo (A) revelou que a maior variância encontra-se entre os grupos (68,31%) e que o índice de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST}) é de 0,68. Para a estrutura com as espécies *M. liza* e *M. platanus* como um grupo e *M. curema* e *M. hospes* como outro grupo (B) mostrou que a maior variância também é entre as espécies (66,47%), com um F_{ST} de 0,83. Os outros índices, de fixação regional (F_{CT}) forneceu um valor de 0,5 e de fixação local (F_{SC}) um valor de 0,66, altamente significativos, sendo maiores do que 0,4. Já a estrutura para *M. hospes* como um grupo, e todas as populações de *M. curema* como outro grupo (C), permitiu-se identificar que a maior variância está entre as populações dentro dos grupos (65,59%) com os índices de F_{ST} e F_{SC} muito similares (0,69 e 0,68, respectivamente), além de um F_{CT} muito baixo (0,037).

TABELA 2.I. Resultados obtidos da análise de variância molecular (AMOVA), tendo em vista as três estruturas testadas. Em (A) todas as espécies e os exemplares analisados como um único grupo, em (B) as espécies *Mugil platanus* e *M. liza* como um grupo e *M. curema* e *M. hospes* como outro grupo e em (C) *M. hospes* como um grupo e todos os exemplares das populações de *M. curema* analisados como o outro grupo.

A.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	8	78.995	2,06940 Va	68,31
Dentro das populações	30	28,800	0,96000 Vb	31,69
Total	38	107,795	3,0294	
Índice de fixação	$F_{ST}=0,68$			

B.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	1	42,583	3,79164 Va	66,47
Entre as populações dentro dos grupos	7	36,412	0,95223 Vb	16,69
Dentro das populações	30	28,800	0,96000 Vc	16,83
Total	38	107,795	5,70386	
	$F_{ST}=0,83169$			
Índice de fixação	$F_{CT}=0,66475$			
	$F_{SC}=0,49797$			

C.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	1	8,017	0,11589 Va	3,71
Entre as populações dentro dos grupos	7	70,978	2,05078 Vb	65,59
Dentro das populações	30	28,800	0,96000 Vc	30,70
Total	38	107,795	3,12667	
	$F_{ST}=0,692$			
Índice de fixação	$F_{CT}=0,03706$			
	$F_{SC}=0,68115$			

2.5. DISCUSSÃO

O método de PCR-RFLP vem sendo utilizado com sucesso para distinguir indivíduos em vários níveis taxonômicos (CORONEL *et al.*, 2004; TELETCHA, 2009; BUI *et al.*, 2011; PATRELLE *et al.*, 2011), uma vez que produz frações de *amplicons* que oferecem perfis distintos entre as espécies, entre populações de espécies e até mesmo entre indivíduos dentro das populações (LIU; CORDES, 2004). Os dados aqui obtidos mostraram perfis COI distintos para os acessos de *Mugil curema*, além de evidenciar perfis COI espécie-específicos e outros compartilhados com outras espécies co-genéricas (FIGURAS 2.02). O poder resolutivo do DNA Barcode (COI) (HEBERT *et al.*, 2003; HEBERT *et al.*, 2010) permitiu a distinção de espécies co-genéricas com apenas uma única enzima de restrição (ALVARADO-BREMER *et al.* 2005). Em Mugilideos, PAPASOTIROPOULOS *et al.* (2002) e TRAPE *et al.* (2009) encontraram níveis elevados de polimorfismo genético entre as espécies examinadas e em alguns casos a variação sugeriu perfis espécie-diagnósticos. Assim, os dados aqui obtidos corroboram o poder resolutivo dos PCR-RFLPs de COI na distinção de espécies do gênero *Mugil*, sugerem uma possível sinonímia taxonômica entre *Mugil curema* e a população de *M. hospes* acessada e permitiram a identificação de descontinuidades populacionais em *M. curema*. Assim tais resultados apontam para a existência de uma diversidade oculta em *M. curema* na costa do Brasil, em especial na costa do Nordeste oriental.

No tocante à descontinuidades populacionais em *M. curema*, dados provenientes da citogenética mostraram o ocorrência de três cariótipos distintos para a espécie ao longo da costa atlântica das Américas (LEGRANDE; FITZSIMONS, 1976; NIRCHIO; CEQUEA, 1998; NIRCHIO *et al.*, 2003; NIRCHIO *et al.*, 2005; HARRISON *et al.*,

2007). Em termos moleculares (12S rRNA, Phe, 16rDNA, Citocromo b e COI), duas e três também são as quantidades de populações encontradas respectivamente por HERAS *et al.* (2009), FRAGA *et al.* (2007) e AURELLE *et al.* (2008). Já com dados morfométricos e moleculares e apenas com exemplares da Argentina, foi encontrado apenas um grupo de *M. curema* (HERAS *et al.* 2006). Já os perfis COI aqui observados indicam, assim como foi observado por Durante *et al.* (2012), a ocorrência de 4 populações de *M. curema* na costa do Brasil, em especial duas destas exclusivas do Nordeste oriental do Brasil (Haplótipos I e III; FIGURA 2.02 e 2.03), indicando assim como observado na pescada-gó (SANTOS *et al.*, 2006) populações exclusivas para diferentes regiões geográficas. Mugilideos apresentam um ovo com grande quantidade de óleo que permite uma fase larval planctônica de diversas semanas (ANDERSON, 1957). A combinação dos dados aqui obtidos quanto aos haplótipos exclusivos com informações oceanográfica e às características dos ovos dessa espécie, reforçam a hipótese da diversidade oculta em *M. curema* devido a regimes autóctones regionais de retenção larval, favorecendo o isolamento genético. Tal conclusão refuta a idéia de que populações de peixes nos extremos da distribuição apresentam mais estruturação genética (WILLIAMS *et al.*, 2008).

Os locais das amostras podem influenciar tanto na quantidade como na qualidade das populações encontradas pelos diferentes autores. O que pode ser constatado é que nos extremos da distribuição atlântica-americana de *M. curema* (Argentina e EUA – regiões subtropicais) existe uma estruturação (apenas uma população é encontrada) (LEGRANDE; FITZSIMONS, 1976; HERAS *et al.*, 2006; 2009), e o mesmo ocorre para a amostragem de Cananéia/SP, onde apenas um haplótipo (IV) foi encontrado. O esperado, seria que esse haplótipo fosse exclusivo desse estuário, uma vez que espécies estuarino-dependentes em regiões subtropicais apresentam uma maior

estruturação genética populacional (WILLIAMS *et al.*, 2008), mas é provável que nesse caso, em um contexto histórico evolutivo, Cananéia esteja fornecendo diversidade genética para o Nordeste, por condições oceanográficas sazonais (VALENTE *et al.*, 2005, LIRA *et al.*, 2010), que podem facilitar o transporte larval no sentido Sul-Norte.

A estruturação genética representa o grau de distanciamento genético entre as populações das espécies e também o patamar de isolamento genético-evolutivo entre as espécies. Representa ainda, de forma indireta, o nível de fluxo gênico entre tais unidades biológicas e pode ser estimado pelo o índice de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST}) (WRIGHT, 1978). Os dados da AMOVA indicaram algumas distinções interespecíficas, bem como diferenciações genéticas muito acentuadas ($F_{ST} > 0,25$), em todas as três estruturas testadas. Em especial, destacaram-se as indistinções genético-evolutivas entre *M. curema* e *M. hospes* com um F_{CT} menor que 5% (TABELA 2.1.C), bem como entre *M. platanus* e *M. liza*. Porém, foram também observadas divisões genético-evolutiva entre as populações de *M. curema*. Tais evidências, associadas àquelas das análises de agrupamento pela similaridade (NJ) e por evolução (MP), com seus respectivos testes estatísticos de sustentação de ramos, se corroboram mutuamente e apontam uma hipótese de falta de coesão genético-evolutiva entre as populações de *M. curema* (Figuras 2.05 e 2.05). Estas evidências argumentam em favor da hipótese de retenção não aleatória de larvas em regiões de recrutamento, favorecendo a divisão genético-evolutiva entre as populações de *M. curema*.

No tocante aos dados genético-evolutivos aqui disponibilizados, uma indefinição taxonômica desponta entre *Mugil hospes* e uma população de *M. curema* (Haplótipo II). Resultados semelhantes foram encontrados por FRAGA *et al.* (2007) e AURELLE *et al.* (2008). À priori poderia ser sugerida uma hipótese de sinonímia júnior para *M. hospes* em relação a *M. curema*. Entretanto estas

espécies têm características morfológicas suficientes que a sustentam como táxons válidos (MENEZES, 1983 [vide *M. gaimardianus* Desmarest, 1831, nome suprimido pelo ICZN (1994)]; THOMSON, 1997; IBÁÑEZ *et al.*, 2011 [forma das escamas]). Porém, a falta de resolução entre tais espécies pelos dados da região barcode possibilitam a formulação de uma hipótese alternativa, que sugere uma recente divisão entre estas espécies. Tal hipótese poderia ser testada mediante uma revisão taxonômica e cladística entre *M. hospes* e *M. curema*.

De acordo com FRAGA *et al.* (2007) ,AURELLE *et al.* (2008) e Durand *et al.* (2012) foi identificada uma outra população de *M. curema* proximamente relacionada com *Mugil incilis*, Hancock, 1830. Diante das evidências aqui observadas entre populações de *M. curema*, *M. hospes* e *M. incilis*, argumenta-se em favor de que *M. curema* pode não ser um táxon monofilético, mas sim um complexo de espécies crípticas. Seguindo os princípios básicos da sistemática filogenética (AMORIM, 2002), tal complexo seria formado por quatro espécies vivendo em simpatria, uma para cada haplótipo encontrado. Espécies crípticas e complexo de espécies como em *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (JAMANDRE *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2011) e outros gêneros (HERAS *et al.*, 2009; DURAND *et al.*, 2012) são fatos recorrentes em Mugilidae.

No que se refere à inconsistência genético-evolutiva entre *Mugil platanus* e *M. liza*, os resultados deste trabalho corroboram os resultados da taxonomia morfométrica clássica, que indicam que *M. platanus* é sinonímia júnior de *M. liza* (MENEZES *et al.*, 2010). O poder resolutivo da PCR-RFLP, as feições moleculares de COI (HEBERT *et al.*, 2003; HEBERT *et al.*, 2010), as análises de agrupamento aqui realizadas e a estatística de árvores, juntamente com informações de outros genes mitocondriais (AURELLE *et al.*, 2008; HERAS *et al.*, 2009), reiteram *Mugil platanus* e *M. liza* como

entidades indistintas. Ressalta-se que a diferença entre as espécies é apenas seu local de ocorrência, sendo o estado do Rio de Janeiro/Brasil o limite norte da distribuição de *M. platanus* e limite sul da distribuição de *M. liza* (MENEZES, 1983). Assim, sugere-se o uso de marcadores moleculares de evolução mais rápida (p.ex. regiões nucleares microssatélites) afim de identificar populações distintas de um mesmo recurso. Como *M. platanus* é um recurso pesqueiro importante nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, medidas de manejo seriam realmente mais eficazes, desde que evidências genético-populacionais estivessem disponíveis.

Os resultados aqui encontrados vão muito além do simples reconhecimento de padrões populacionais ou da elucidação de problemas taxonômicos ou ainda do possível reconhecimento de um complexo de espécies. A elucidação desses aspectos destinam-se principalmente à conservação do importante e tradicional recurso pesqueiro, que é a tainha na região Nordeste do Brasil. A conservação da biodiversidade, atualmente, abrange sobretudo a variação genética intraespecífica (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). Avanços recentes da biologia molecular tem ajudado a desvendar padrões estruturais previamente ocultos (SALA-BOZANO *et al.*, 2009) e a genética pesqueira tem concentrado esforços no delineamento das fronteiras geográficas dos estoques pesqueiros (HAUSER; CARVALHO, 2008). Entretanto, esforços nesse sentido são inúteis quando, como no caso de *M. curema*, não é possível determinar apenas uma área ou poucas áreas como geradoras de diversidade. Aliando a falta de barreiras geográficas claras entre as populações distintas encontradas aqui à forma tradicional de sua pesca, a criação de uma ou algumas poucas áreas de proteção marinha (PALUMBI, 2003), deve ser suplantada por outras estratégias integradas de manejo e conservação, assim como a determinação de épocas e locais de defeso, bem como tamanho mínimo de captura (FONTELES-FILHO, 2011).

3. CAPÍTULO 2

Conectividade genética, variação morfológica e conservação de *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) na costa brasileira.

Gondolo, G. F.^{*1,2,3}; Silva, A. S.⁴; Moraes, D. A.^{2,5} & Torres, R. A.^{2,3}

1. Laboratório de Ictiologia, Universidade Estadual do Piauí, *Campus* Heróis do Jenipapo. Av. Sto. Antônio s/n, São Luís, Campo Maior/PI, Brazil. CEP: 64.280-000.

2. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes do Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE. Brazil. CEP: 50.670-420.

3. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes do Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE. Brazil. CEP: 50.670-420.

4. Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela. Bloco 16, Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550.

5. Laboratório de Mastozoologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes do Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE. Brazil. CEP: 50.670-420.

*Autor para correspondência. e-mail: guilherme.gondolo@uespi.br

3.1. RESUMO

A conectividade entre populações de peixes no ambiente marinho influencia diretamente as estratégias de conservação, principalmente no que se refere aos estoques pesqueiros. Os padrões de conectividade podem ser verificados através de marcadores moleculares, como ISSR e também com o auxílio da morfometria geométrica. No Brasil, *Mugil curema*, uma espécie estuarina e importante recurso pesqueiro tradicional, apresenta uma descontinuidade populacional, evidenciada tanto pela citogenética, como por marcadores moleculares. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar por métodos genéticos e morfológicos, se *M. curema* pode ser considerada uma população panmítica. Amostras provenientes de Natal/RN, Cabedelo/PB, Ilha de Itamaracá/PE, Tamandaré/PE, Piaçabuçu/AL e Cananéia/SP, forneceram resultados que evidenciam que de maneira geral a população ainda apresenta um bom estado de conservação em termos globais, exceto em Cananéia onde a diversidade genética apresentou níveis preocupantes. A coesão genético-evolutiva das populações, corroborada pela morfometria geométrica, de *M. curema*, mostrou que (1) a distância geográfica não influi na estruturação populacional encontrada; (2) assim como em outros trabalhos, foram encontradas diferenças muito acentuadas entre as populações; (3) os indivíduos do estuário de Itamaracá/PE apresentam uma história filopatrica. No que tange a conservação do recurso pesqueiro, é evidente que Piaçabuçu/AL fornece diversidade genética aos estuários imediatamente adjacentes, mas de forma geral ficou claro que os seis estuários não podem ser regidos pelas mesmas ações e medidas para a conservação do estoque de tainhas.

PALAVRAS-CHAVES: ISSR, Morfometria geométrica, Estruturação genética, Filopatria, Atlântico Sul, Tainha/Parati.

3.2. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho parece exibir poucas barreiras ao fluxo gênico, em comparação a ambientes aquáticos continentais, sugerindo que organismos marinhos possuam espécies com uma maior distribuição geográfica (PAMPOULIE *et al.*, 2004). Entretanto, massas d'água distintas, correntes marinhas, o relevo do fundo, influências como de estuários, de barreiras climáticas e as grandes distâncias podem restringir a dispersão de larvas e adultos, propiciando assim, a possibilidade de diferenciação genética e morfológica entre populações (SINCLAIR, 1988; GRANT; BOWEN, 1997; COWEN *et al.*, 2000). Os ecossistemas marinhos são ambientes complexos e distintos, cada um com suas peculiaridades (NAGELKERKEN, 2009), sugerindo a investigação caso à caso dos processos de diferenciação populacional.

Os padrões de conectividade populacional de espécies marinhas são temas relacionados diretamente às estratégias de manejo de áreas (PALUMBI, 2003). Geralmente, estudos de conectividade buscam determinar a origem do recrutamento larval e os locais de assentamento das larvas dispersantes (PINEDA *et al.*, 2007), uma vez que larvas marinhas exibem diversos padrões de dispersão, desde poucos metros até milhares de quilômetros de conexão (KINLAN; GAINES, 2003; SHANKS *et al.*, 2003). Assim, os desafios de abordagens evolutivo-conservacionistas em espécies marinhas e estuarinas são os de obter diagnósticos dos processos responsáveis pela diferenciação de populações próximas ou distantes geograficamente. Como consequência, a estrutura genética dos organismos tem sido observada por meio do uso de diversos tipos de estimativas, oriundas da descoberta dos mais inusitados níveis de

diferenciação genética para diferentes marcadores (POGSON *et al.*, 1995; LEMAIRE *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2005).

O entendimento sobre a dinâmica biológica das populações das espécies marinhas depende de uma investigação caso a caso, acerca dos princípios e processos que vêm governando a história desta biodiversidade, uma vez que os dados parecem indicar o ambiente marinho não é tão homogêneo como era previsto (SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006). Nesse sentido, as abordagens genômicas e morfológicas, isoladas ou conjuntamente, têm contribuído sobremaneira na elucidação destas questões de relacionamento histórico/espacial das populações. Portanto, tais abordagens vêm de encontro às expectativas de sinergia que foquem na determinação dos padrões de distribuição da biodiversidade, especialmente aquela do ambiente marinho.

Existem diversos modos de averiguar a variabilidade existente entre os indivíduos em uma determinada espécie. O método mais tradicional é pela diversidade morfológica. Todavia, tais características são influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade, podendo não apresentar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos (BURNS *et al.*, 2007). Neste sentido, outros métodos permitem o acesso à variação de caracteres com menor influência ambiental, tal como aqueles de natureza genética dos organismos (ZUCCHI, 2002; WEISING *et al.*, 2004). Sendo assim, o uso combinado das evidências morfológicas com aquelas da variabilidade genética tendem a revelar padrões mais precisos acerca das particularidades populacionais das espécies.

Entre os métodos de acesso à informação genética, os marcadores nucleares possuem uma boa resolução, principalmente no nível populacional. Os marcadores ISSRs [*Inter Simple Sequence Repeats*; ZIETKIEWICZ *et al.* (1994) e GUPTA (1994)] são sequências

de nucleotídeos, entre uma a seis bases repetidas em *tandem*, cujos primers são ancorados em extremidades das regiões microssatélites (SSRs). Os ISSRs podem ser utilizados como marcadores na resolução de vários problemas biológicos, entre eles a detecção de variedades intraespecíficas, particularmente em espécies economicamente importantes (ALCÁNTARA, 2007). Assim, ISSRs são úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade entre indivíduos proximalmente relacionados (WANG *et al.*, 1998; MCGREGOR *et al.*, 2000; RAINA *et al.*, 2001).

Além da genética, o estudo de continuidade ou descontinuidade populacional pode ser realizado com o auxílio da morfometria geométrica. Tal abordagem é capaz de descrever e localizar claramente as regiões de mudanças na forma e, sobretudo, de reconstruir e restituir graficamente estas diferenças (MONTEIRO; REIS, 1999). É uma técnica extremamente sensível para revelar variações sensíveis de forma, como resposta à diferentes pressões seletivas no nível de populações (CLARK, 1992) ou ainda como evidências de eventos cladogenéticos. Nesse sentido, diversas abordagens genético-morfológicas têm revelado que a análise conjunta dessas metodologias proporcionam um melhor entendimento dos relacionamentos entre populações de diversos grupos animais, inclusive em espécies de peixes (LEE; FOIGHIL, 2004; MATHEWS *et al.*, 2008; CALVO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011; MUTO *et al.*, 2011; SPREITZER *et al.*, 2012; D'ANATRO; LESSA, 2011; DWIVEDI; DUBEY, 2012)

Os indivíduos de *M. curema* parecem ser dependentes das regiões estuarinas, local onde os indivíduos jovens buscam abrigo e alimento, (SILVA, 2007). O esforço de captura de *M. curema* apresenta uma tendência de crescimento na região Nordeste do Brasil (LESSA *et al.*, 2006). Entre os anos de 1993 até 2005 a produção de tainha aumentou quase sete vezes, sobretudo pelo aumento do

esforço de pesca e da pesca da saúna (SILVA, 2007). Especialmente no estado de Pernambuco, *M. curema* representa 96% da captura de tainhas e os juvenis representam cerca de 80% do capturado desta espécie (SILVA, 2007). Devido a este patamar de exploração e à dependência ontogenética dos estuários, estudos de conectividade genética e morfológica, relativos ao reconhecimento dos limites geográficos de populações, se tornam cruciais para a sustentabilidade do estoque de *Mugil curema*.

Evidências disponíveis sobre *Mugil curema* revelam uma hipótese de descontinuidade populacional ao longo de sua distribuição geográfica. Amostras oriundas do Golfo de México (Louisiana/EUA) e do mar do Caribe (Venezuela), revelaram uma constituição cariotípica de $2n = 28$ na região Norte-Americana e $2n = 26$ na região Sul-Americana (LEGRANDE; FITZSIMONS, 1976; NIRCHIO; CEQUEA, 1998). Mais recentemente a hipótese de descontinuidade populacional em *M. curema* recebeu reforço, dada a conspícua diversidade cariotípica observada entre amostras do Golfo do México, Venezuela e Brasil (NIRCHIO *et al.* 2005). No tocante à feições moleculares, o tratamento filogenético de sequências mitocondriais (16S e cit b) de *M. curema*, oriundos das regiões litorâneas dos estados do Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina revelaram dois grupos genéticos descontínuos indistinguíveis sob o ponto de vista morfológico, porém coexistentes ao longo da área acessada (FRAGA *et al.* 2007).

A possível descoberta de populações descontínuas, populações disjuntas e/ou espécies crípticas, dentro de unidades taxonômicas teoricamente uniformes, constituem uma prática necessária para um planejamento de conservação de um recurso renovável. Portanto, tendo em vista as evidências acima relatadas o presente trabalho teve como objetivos demonstrar por métodos genéticos-morfológicos, se *Mugil curema* pode ser considerada uma

população panmítica na costa do Brasil; qual o status de conservação (patamar de variabilidade genética) da espécie na região; se existe descontinuidade genética-morfológica de *M. curema* na região estudada; qual o nível de fluxo genético que *M. curema* apresenta ao longo dos estuários estudados na região e mediante as evidências observadas, qual a melhor estratégia conservacionista para *M. curema* na região estudada que permita a exploração autossustentável.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas amostragens de 30 indivíduos *Mugil curema*, por localidade, proveniente dos estuários dos rios Potengi (Natal/RN: 05°45'04.23"S; 35°11'58.42"W), Paraíba do Norte (Cabedelo/PB: 06°58'13.26"S; 34°50'48.21"W), ambos coletados em março de 2009; do canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá/PE: 07°48'51.07"S; 34°51'06.96"W), coletados em janeiro de 2009; do rio Formoso (Tamandaré/PE: 08°41'38.67"S; 35°05'00.07"W), rio São Francisco (Piaçabuçu/AL: 10°29'46.67"S; 36°23'43.59"W), ambos coletados em fevereiro de 2009 e rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP: 25° 00'53.41"S; 47°55'22.29"W), amostrados em outubro de 2010. Estes peixes compuseram a principal unidade amostral. Além destas, espécimes de *Mugil hospes* Jordan & Culver, 1895 e de *Mugil platanus* Günther, 1880, foram amostrados também em Cananéia na mesma época das coletas de *Mugil curema*. Um exemplar de *Mugil liza* Valenciennes, 1836, foi obtido no estuário de Cabedelo/PB e outros dois de Maragogi/AL (09°00'25"S; 35°12'30"W) foram também amostrados (FIGURA 3.01). Todos os indivíduos de todas as espécies foram identificados com o auxílio das chaves de identificação de Menezes (1983), Harrison (1995) e Thompson (1997). Todas as amostras foram acondicionadas em etanol 96% e mantidas a -20 °C. O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo modificado de fenol-clorofórmio (Sambrook; Russel, 2001). Espécimes voucher encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e na Coleção Ictiológica da Universidade Federal da Paraíba, sob os seguintes e respectivos números de tombo: MZUSP 100703; MZUSP 100704; MZUSP 100705; UFPB 9089; UFPB 9090; UFPB 9091; UFPB 9092; UFPB 9093; UFPB 9094; UFPB 9095; UFPB 9096.



FIGURA 3.01. Mapa com as localidades de amostragens de *Mugil curema*, *M. platanus*, *M. liza* e *M. hospes*.

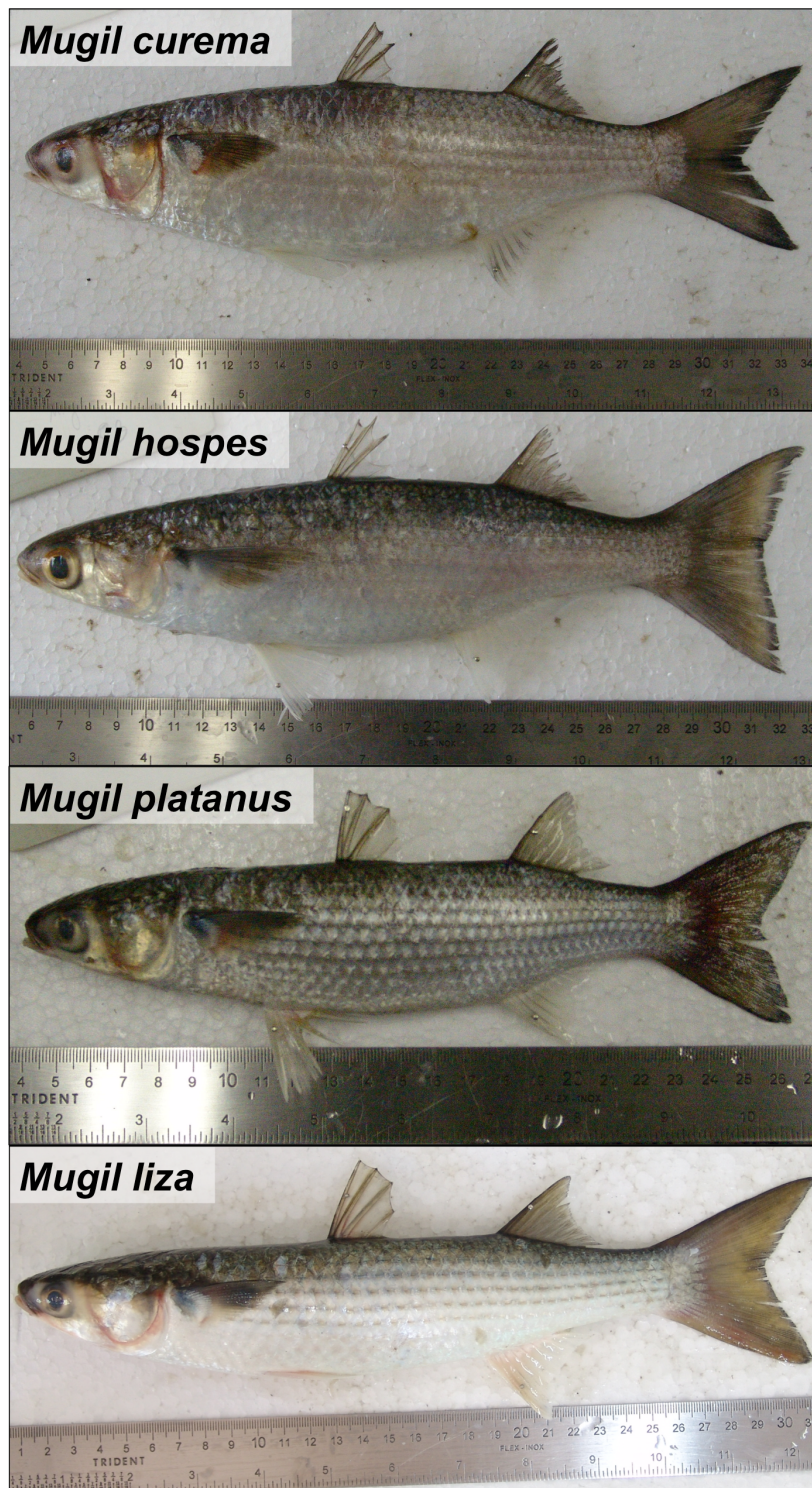


FIGURA 3.02. Exemplos das espécies do gênero *Mugil*.

Análises moleculares.

Foram retiradas amostras de tecidos de 30 exemplares de *M. curema*, por localidade, além de três exemplares das outras três espécies. Tais amostras foram acondicionados em etanol 96% e mantidas a -20 °C. O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo modificado de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para as análises moleculares, foram testados inicialmente 17 primers *ISSRs* de sequências repetidas de dois ou quatro nucleotídeos, em dois exemplares de *M. curema* de cada localidade. Foram escolhidos com base em sua eficácia o primers que ao se somarem revelassem pelo menos de 60 loci polimórficos, seguindo as orientações de TELLES *et al.* (2001). Dessa forma, foram escolhidos sete primers, que revelaram o maior polimorfismo (TABELA 3.I).

As amplificações foram realizadas por PCR em um volume final de 20 µl, que consistiu em 1 unidade de Taq DNA Polimerase (New England Biolabs), 2 µL de solução tampão (10x), 0,5 µL de MgSO₄ (20 mM), 0,5µL de primer (50 µM), 1,5 µL de dNTP (1,5 mM), ~20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler e consistiram em um ciclo de quatro minutos a 94 °C; 39 ciclos de 40 segundos a 94 °C, na temperatura de anelamento de cada *primer* (TABELA 3.I), dois minutos a 72 °C para elongação, com uma elongação final de sete minutos aos mesmos 72 °C. As reações foram acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA, que foi substituído por água ultrapura.

Os produtos da PCR, foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,8%, em cuba horizontal, contendo tampão TBE 0,5x, (Tris 0,89 M, Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 0,01 M, pH = 8,3), a 2,5V por centímetro de gel. Cada poço do gel foi preenchido com um

mix contendo 10µL da reação de PCR, 1,5µL de Gel Loading Dye Blue (6x) e 1µL de Gel Green (0,5ml 10.000x em H₂O). Com a finalidade de padronizar as comparações dos resultados foi utilizado em um dos poços 2µL do marcador DNA Ladder 1Kb com 1,5µL de Gel Loading Dye Blue (6x) e 1µL de Gel Green. Os géis foram fotodocumentados em transluminador sob fonte de luz ultravioleta.

TABELA 3.I. Primers ISSRs testados, suas respectivas sequências e temperatura de anelamento. Primers sublinhados foram os selecionados por apresentarem maior polimorfismo.

Primer	Sequência	Temp. de anelamento (°C)	Nº de loci polimórficos
<u>ISSR 01</u>	<u>(AG)8T</u>	<u>50,4</u>	<u>24</u>
<u>ISSR 02</u>	<u>(AG)8C</u>	<u>52,8</u>	<u>20</u>
<u>ISSR 03</u>	<u>(GA)8T</u>	<u>50,4</u>	<u>29</u>
ISSR 04	(GA)8C	52,8	s.a.
ISSR 05	(CT)8G	52,0	13
<u>ISSR 06</u>	<u>(AG)8YC</u>	<u>52,8</u>	<u>19</u>
ISSR 07	(AG)8YA	54,0	18
ISSR 08	(GA)8YT	52,8	16
ISSR 09	(GA)8YC	52,8	14
<u>ISSR 10</u>	<u>(GA)8YG</u>	<u>54,0</u>	<u>21</u>
ISSR 11	(CT)8RA	50,0	17
ISSR 12	(AC)8YG	54,0	15
ISSR 13	(GGAC)3A	51,0	14
ISSR 14	(GGAC)3C	51,0	17
<u>ISSR 15</u>	<u>(GGAC)3T</u>	<u>51,0</u>	<u>25</u>
<u>ISSR 16</u>	<u>(AACC)4</u>	<u>51,0</u>	<u>20</u>
ISSR 17	(GGAC)4	51,0	14

Nota: s.a.= sem amplificação.

Após a inspeção visual das bandas nas imagens dos géis, foi codificada uma matriz de presença e ausência (1 e 0 respectivamente) no software Nexus Data Editor (NDE) versão 0.50 (PAGE, 1998). As

análise de *Neighbor Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) foram desenvolvidas por meio do software Paup v.4.0 b10 (SWOFFORD, 2000) através da interface gráfica do PaupUp (CALENDINI; MARTIN, 2005). A análise de NJ forneceu a distância genética (NEI, 1972) entre os terminais. A análise de MP foi realizado através de busca heurística, com os caracteres designados como “não-ordenados”, com pesos iguais em sob otimizações Acctran (*Accelerated transformation*) e Deltran (*Delayed transformation*). Ambas as análises foram desenvolvidas usando as espécies *Mugil platanus*, *M. hospes* e *M. liza* como grupos externos. O consenso de maioria foi computado e a robustez dos ramos resultantes foi inspecionada através de análises de *bootstrap* e *jackknife*, com 1.000 pseudo-réplicas.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi desenvolvida para testar os desvios da variância molecular para uma população panmítica e entre os agrupamentos observados nas análises de NJ e MP. Para tal, foi utilizado o software ARLEQUIN 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Pela AMOVA, ainda foram estimados os índices de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST}), o F_{CT} e F_{SC} para avaliar a proporção de variação entre grupos e entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. Foram testados estatisticamente três modelos de estruturas genético-evolutiva: (1) com todos os indivíduos de todas as quatro espécies como um único grupo, (2) *M. curema* como um grupo e as demais espécies (*M. liza*, *M. platanus* e *M. hospes*) em um outro grupo e (3) apenas as seis localidades de *M. curema* como um único grupo.

Os dados de distância genética par-a-par entre os indivíduos de *M. curema*, fornecidos pelo NJ, permitiram a construção de uma matriz das médias da distância genética entre todos os indivíduos para as localidades estudadas. Aliados aos dados de distância geográfica entre todas as populações amostradas partir desta, foi realizada uma regressão linear entre os dados obtidos de distância

genética e distância geográfica entre todas as populações amostradas, para observar a existência ou não de correlação entre estas distâncias por meio do software Statistica v.6.0 (Statsoft Inc.). A distância, em quilômetros, foi estimada em linha reta entre as localidades amostradas ao longo do costa pelo uso do Google Earth.

Os parâmetros de genética populacional do tipo fluxo gênico (N_m = Número de migrantes por geração) e diferenciação genética (G_{ST}) globais, foram obtidos por meio do uso do software Popgen 1.32 (YEH *et al.*, 1999).

Pelo método Bayesiano foram realizadas estimativas de teste de estruturação populacional, com finalidade de observar o possível número de populações genéticas (K) por meio do software STRUCTURE 2.3.3 (FALUSH *et al.*, 2003, 2007; HUBISZ *et al.*, 2009; PRITCHARD *et al.*, 2000).

Análises de morfometria geométrica.

Para as análises morfológicas, foram utilizados 200 indivíduos do gênero *Mugil*, sendo destes 09 de espécie *Mugil hospes*, 12 de *Mugil platanus*, ambos provenientes do estuário do Rio Ribeira de Iguape em Cananéia/SP; 01 de *Mugil liza* (proveniente do rio Paraíba do Norte, Cabedelo/PB); e 178 da espécie alvo *Mugil curema* dos seis estuários amostrados, sendo que um desses exemplares é uma fotografia do Lectótipo da espécie (MNHN A-3638) (FIGURA 3.03). Imagens digitais foram obtidas do lado esquerdo do corpo distendido dos exemplares. Para que fosse possível a visualização de todos os marcos anatômicos as nadadeiras dorsais, anal e pélvica esquerda foram distendidas. Para cada exemplar foram registrados 17 marcos

anatômicos (FIGURA 3.04). Os marcos anatômicos: Tipo I (LM: 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16 e 17); marco anatômico do Tipo II (LM: 5); e marco anatômico do Tipo III (LM: 1, 2, 3 e 13).



FIGURA 3.03. Lectótipo de *Mugil curema* (sintipo). MNHN A-3638. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, França. Foto: Ferrara, C. 2005.

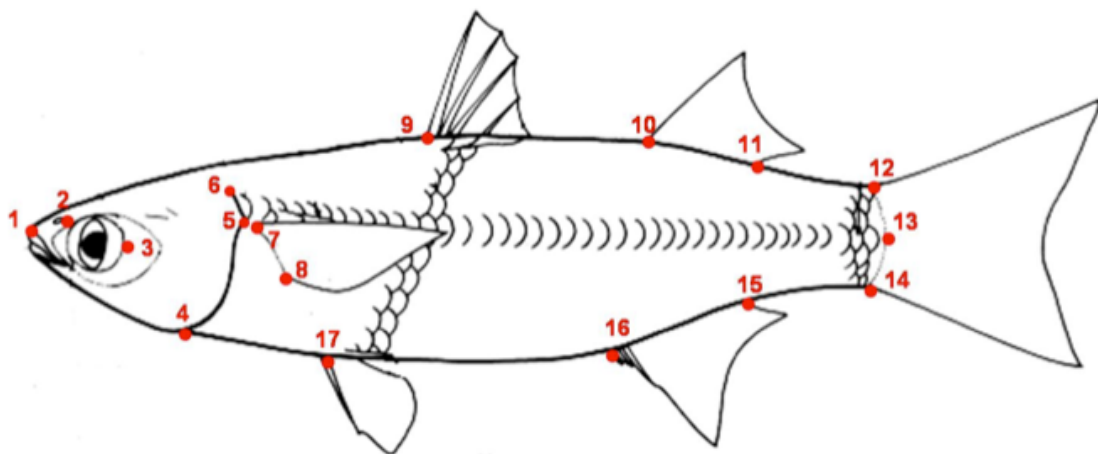


FIGURA 3.04. Desenho esquemático de *Mugil* com a indicação do local de digitalização dos 17 LMs nas imagens dos peixes coletados.

Com o auxílio do software TpsUtil 1.44 (ROHLF, 2009), foi construído um arquivo que permitisse a análise das imagens previamente capturadas. Posteriormente os 17 marcos anatômicos (LM) homólogos para os indivíduos foram digitalizados, utilizando-se o

software TpsDig 2.12 (ROHLF, 2008). Com a digitalização dos LMs foi possível obter as coordenadas cartesianas (x e y). Ainda no software TpsDig 2.12, a fim de excluir o efeito do tamanho das análises, foi feita a escala para todos os indivíduos.

Para verificar a precisão entre os LMs foram feitos duas vezes os processos de digitalização dos LMs. A segunda marcação dos LMs ocorreu em dias diferentes com as imagens aleatorizadas, utilizando o software TpsUtil 1.44 (ROHLF, 2009), e serviu para diminuir uma possível tendência (erro) que poderia ocorrer. Foi feita uma ANOVA para cada uma das 17 coordenadas x e y. Os dados obtidos nestas análises foram testados quanto a repetibilidade.

$$Re\,p = \frac{QMF - QME}{QMF + (n - 1) \times QME}$$

Onde:

QMF – Quadrado médio do Fator.

QME – Quadrado médio do Erro.

n – número de vezes que foi feita a remarcação dos LMs.

Através do software MorphoJ 1.00 (KLINGENBERG, 2008), as análises de discriminantes canônicas foram realizada a fim de detectar diferenças morfométricas entre os espécimes. Variáveis canônicas significantes ($p < 0,05$) representaram as combinações ótimas de regiões e variáveis morfométricas, que produziram a melhor discriminação geral entre os grupos. Coeficientes padronizados de cada variável significativa, representaram a contribuição de cada variável morfométrica para a discriminação das amostras entre as espécies do gênero *Mugil* e posteriormente para as diferentes

localidades de coleta de *Mugil curema*. Caracteres com maiores valores absolutos dos coeficientes padronizados são os que têm maior contribuição para a separação dos grupos. Os diagramas de deformação foram obtidos a partir da regressão da variável canônica sobre os componentes de forma, utilizando-se o software TpsRegr 1.37 (ROHLF, 2009).

O centróide constitui um ponto imaginário que representa o centro geométrico do indivíduo, determinando pela média dos valores das posições no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos do corpo dos indivíduos. Assim, o tamanho do espécime é representado em termos do tamanho do centróide. Com base no valor do tamanho de centróide calculado, foi feita uma ANOVA entre as diferentes populações de *M. curema*.

3.4. RESULTADOS

Os resultados das PCRs revelaram bandas que variam entre 200 e 1.600 pares de bases (TABELA 3.II; FIGURA 3.05). As imagens dos géis foram codificados em uma tabela de presença (1) e ausência (0), por peso molecular de cada banda. No total foram obtidos 92 loci polimórficos. Apenas dois *loci* foram verificados exclusivamente nas demais espécies de *Mugil* e não em *M. curema*. Não foi observado nenhum *locus* monomórfico para os espécimes de *M. curema*, nem para as demais espécies quando analisadas globalmente.

TABELA 3.II. Primers utilizados nas reações de PCR, com o número de loci encontrados tanto em *M. curema*, assim como nas demais espécies do gênero *Mugil*. Observa-se também os extremos dos tamanhos em pares de base (pb) encontrados em cada primer.

Primer	Nº de Loci Polimórficos em <i>M. curema</i>	Nº de Loci polimórficos em todas as espécies	Faixa de tamanho das bandas (pb)
<i>ISSR 01</i>	13	13	300 - 1.500
<i>ISSR 02</i>	12	13	250 - 1.150
<i>ISSR 03</i>	14	15	250 - 1.600
<i>ISSR 06</i>	13	13	250 - 1.500
<i>ISSR 10</i>	11	11	200 - 1.350
<i>ISSR 15</i>	12	12	250 - 1.500
<i>ISSR 16</i>	15	15	300 - 1.600
TOTAL	90	92	

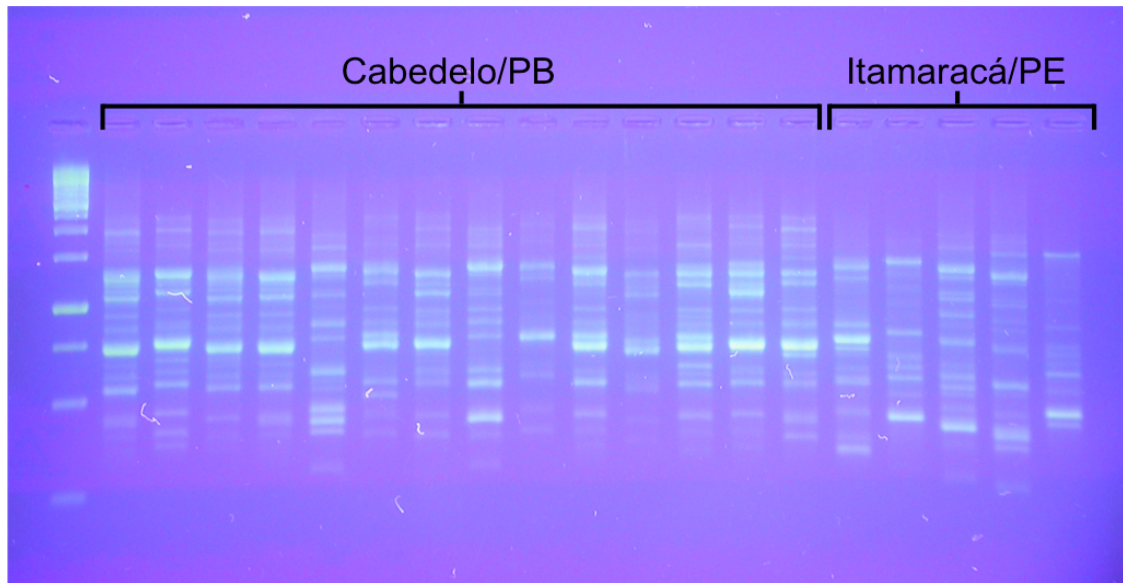


FIGURA 3.05. Eletroforese em gel de agarose a 1,8%. (Primer de *ISSR* 16) exemplificando os perfis *ISSRs* e o polimorfismo das bandas em *M. curema*.
Nota: Primeira banda representa o peso molecular padrão (*Ladder*).

A diversidade genética observada em cada localidade em relação à diversidade total observada, variou pouco, entre um máximo de 85,56% (em Piaçabuçu/AL e Itamaracá/PE) e um mínimo de 70,00% (em Cananéia/SP) (TABELA 3.III). Já a diversidade genética local (número de loci polimórfico em relação à totalidade de loci observados em cada localidade) variou entre um máximo de 89,61% e um mínimo de 44,44%, em Piaçabuçu/AL e Cananéia/SP respectivamente (TABELA 3.IV).

Pela análise de *Neighbour Joining* foi possível observar a existência de dois agrupamentos principais. Um deles agrupou as amostras dos estuários dos rios Formoso (Tamandaré, PE), São Francisco (Piaçabuçu, AL), Potengi (Natal, RN), Ribeira de Iguape, (Cananéia, SP) e Paraíba do Norte (Cabedelo, PB). Neste agrupamento foi observada uma partição da variação genética nas amostras dos estuários dos rios Potengi (Natal, RN) e São Francisco

(Piaçabuçu, AL), além das unidades genéticas mais coesas compreendendo a totalidade dos exemplares de Tamandaré/PE, Cananéia/SP e Cabedelo/PB. Além disso, foi observado que a amostra de Piaçabuçu/AL apresenta relação genética com as amostras dos estuários localizados em Tamandaré/PE e Cananéia/SP. Já o outro agrupamento principal compreendeu a amostra de *M. curema* nativa do estuário do canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá, PE). (FIGURA 3.06). Tais agrupamentos ainda obtiveram um bom suporte de *bootstrap* e *jackknife*, variando de 51 à 100.

TABELA 3.III. Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *M. curema*, em relação ao conjunto total de loci analisados, sendo 30 indivíduos para cada localidade.

Localidade	Nt	Nv	Dg (%)
Cananéia/SP	90	63	70,00
Piaçabuçu/AL	90	77	85,56
Tamandaré/PE	90	69	76,67
Itamaracá/PE	90	77	85,56
Cabedelo/PB	90	76	84,44
Natal/RN	90	75	83,33

Nota: Nt = n° total de loci; Nv = n° de loci variantes; Dg = diversidade genética

TABELA 3.IV. Diversidade genética observada dentro de cada localidade de *M. curema*, em relação ao conjunto total de loci presentes em cada localidade.

Localidade	Ntl	Nvl	Dg (%)
Cananéia/SP	63	28	44,44
Piaçabuçu/AL	77	69	89,61
Tamandaré/PE	69	40	57,97
Itamaracá/PE	77	68	88,31
Cabedelo/PB	76	57	75,00
Natal/RN	75	62	82,67

Nota: Ntl = n° total de loci presentes em cada localidade; Nvl = n° de loci variantes em cada localidade; Dg = diversidade genética.

As distâncias genéticas variaram de 0,65 entre os estuários localizados em Natal/RN e Tamandareé/PE até 0,86 os estuários de Tamandaré/PE e Cananéia/SP. Observou-se que as maiores distâncias genéticas médias ocorreram entre a amostra do estuário do canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá, PE) e todas as outras (TABELA 3.V). A correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as localidades, indicou uma correlação de Pearson negativa ($r = -0,0527$; $p = 0,05$) (FIGURA 3.07).

TABELA 3.V. Valores de distância geográfica (acima da diagonal, em quilômetros) e distância genética (abaixo da diagonal) entre as populações de *M. curema* ao longo da costa brasileira. Em destaque as distâncias genéticas observadas entre a amostra do Canal de Santa Cruz e as demais. Onde: Can/SP = rio Ribeira de Iguape, Cananéia, SP; Pia/AL = rio São Francisco, Piaçabuçu, AL; Tam/PE = rio Formoso, Tamandaré, PE; Ita/PE = Canal de Santa Cruz, Ilha de Itamaracá, PE; Cab/PB = rio Paraíba do Norte, Cabedelo, PB e Nata/RN = rio Potengi, Natal, RN.

	Can/SP	Pia/AL	Tam/PE	Ita/PE	Cab/PB	Nat/RN
Can/SP	--	2.029,5	2.263,7	2.380,5	2.816,9	3.593,9
Pia/AL	0,72721	--	234,2	351,0	436,4	777,0
Tam/PE	0,85985	0,66499	--	116,8	202,2	340,6
Itam/PE	0,74316	0,82484	0,81699	--	85,4	223,8
Cab/PB	0,71990	0,78657	0,68726	0,81995	--	138,4
Nat/RN	0,70588	0,73506	0,65062	0,80425	0,68637	--

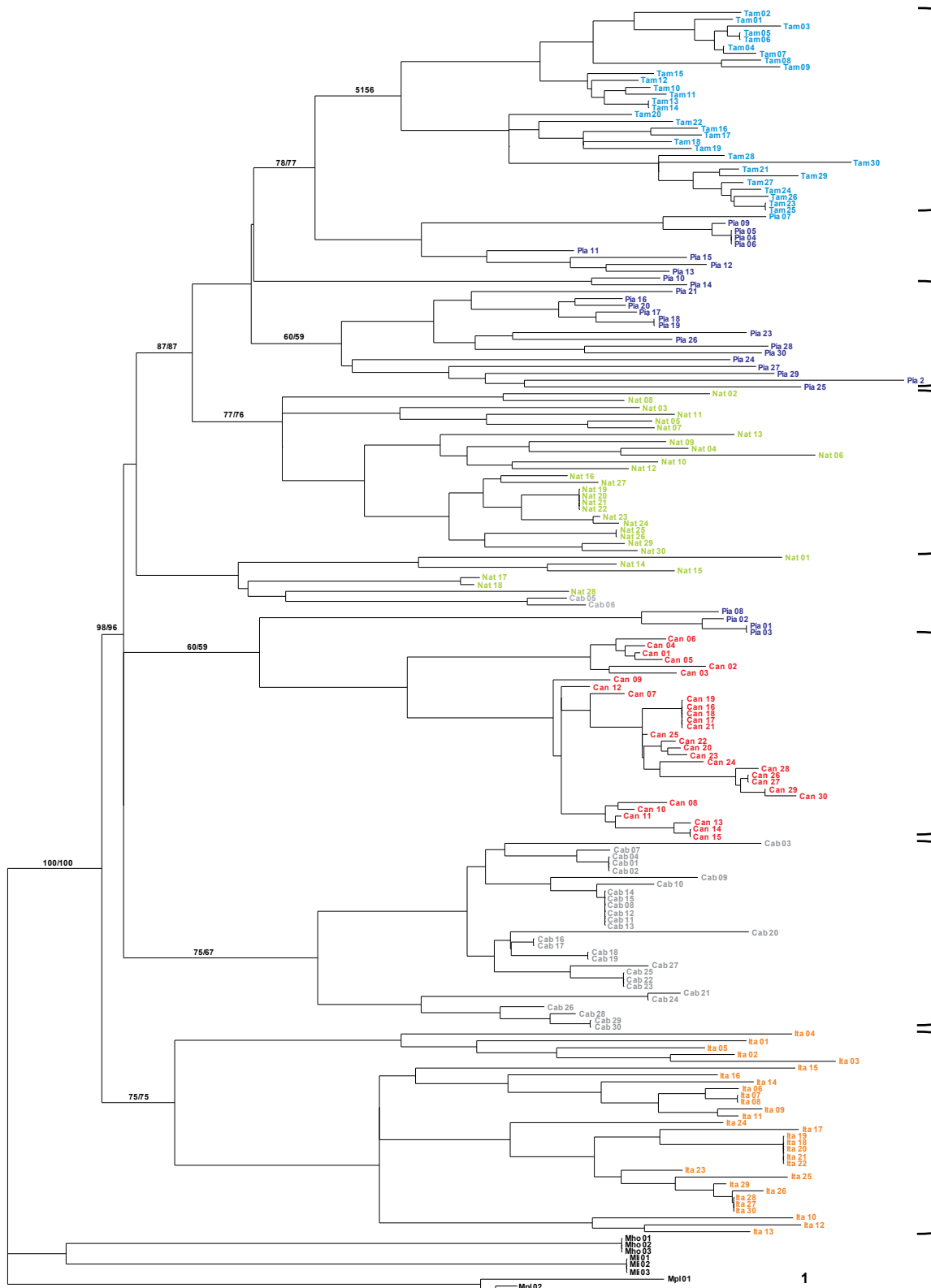


FIGURA 3.06. Topologia de *Neighbor Joining* obtida entre os exemplares de *M. curema* oriundos das localidades amostradas. Nota: As diferentes cores indicam as localidades. Os valores de *bootstrap* e *jackknife* encontram-se indicados nos ramos. Para siglas consulte a Tabela V e o texto.

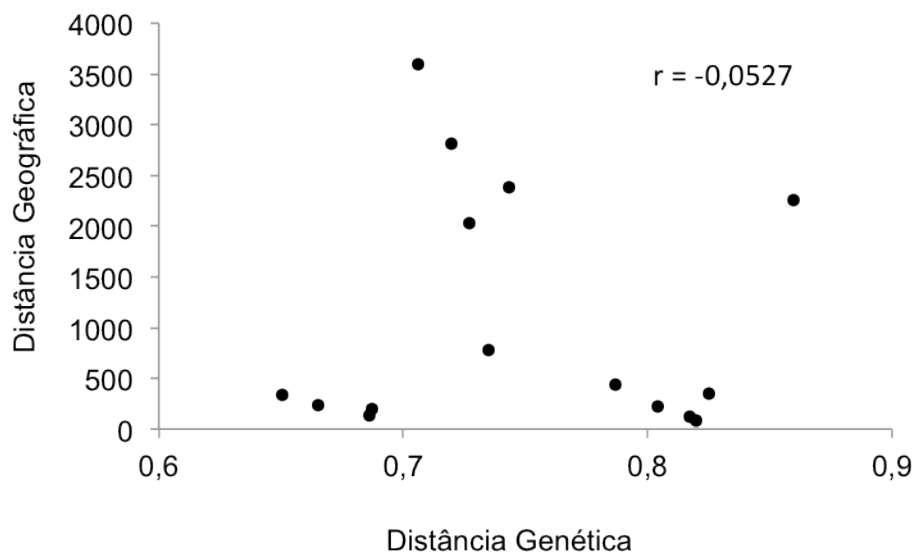


FIGURA 3.07. Regressão entre as médias das distâncias genéticas e distâncias geográficas (km) para as amostras das seis localidades de *Mugil curema* estudadas.

A análise de Máxima Parcimônia gerou 5.000 topologias igualmente parcimoniosas. O consenso estrito gerou uma topologia com 910 passos (L), índice de homoplasia (H_i) de 0,8989, índice de retenção (R_i) de 0,8162 e índice de consistência (C_i) de 0,1011 (FIGURA 3.08). A topologia revelou dois agrupamentos principais. O primeiro agrupamento compreendeu indivíduos de *M. curema* provenientes do rio Formoso (Tamandaré, PE) e do rio São Francisco (Piaçabuçu, AL). Já o segundo agrupou todos os espécimes do rio Potengi (Natal, RN), Ribeira de Iguape, (Cananéia, SP) e Paraíba do Norte (Cabedelo, PB) e do estuário do canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá, PE) e seis indivíduos do rio São Francisco (Piaçabuçu, AL). A topologia ainda revelou que apenas as amostras de Cananéia/SP e Itamaracá/PE se comportaram de forma totalmente coesa (monofilética), sendo que esses dois grupos juntamente com seis indivíduos de Piaçabuçu/AL formam um grupo monofilético com alto suporte estatístico. Evidenciou-se ainda que a maioria dos indivíduos de Cabedelo/PB ($N = 28$) e Piaçabuçu ($N = 24$) também formam grupos coesos (FIGURA 3.08).

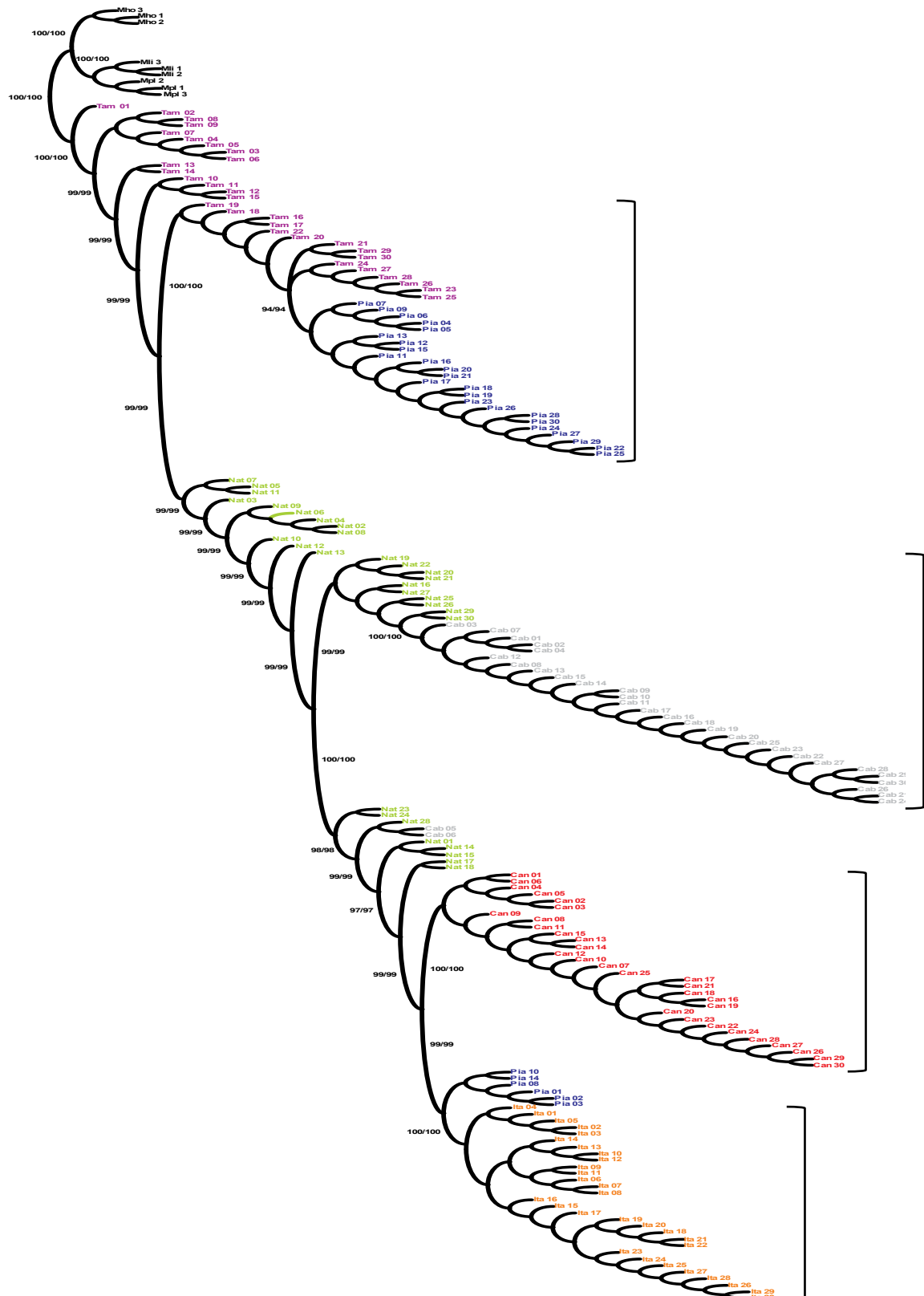


FIGURA 08. Topologia de máxima parcimônia obtida entre os exemplares de *M. curema*. Nota: As diferentes cores indicam a localidade dos espécimes. Os valores de *bootstrap* e *jackknife* encontram-se indicados nos ramos. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto.

A análise de estruturação pelo método Bayesiano, revelou a existência de três populações genéticas ($K = 3$) em *Mugil curema* ao longo das áreas acessadas (FIGURA 3.09).

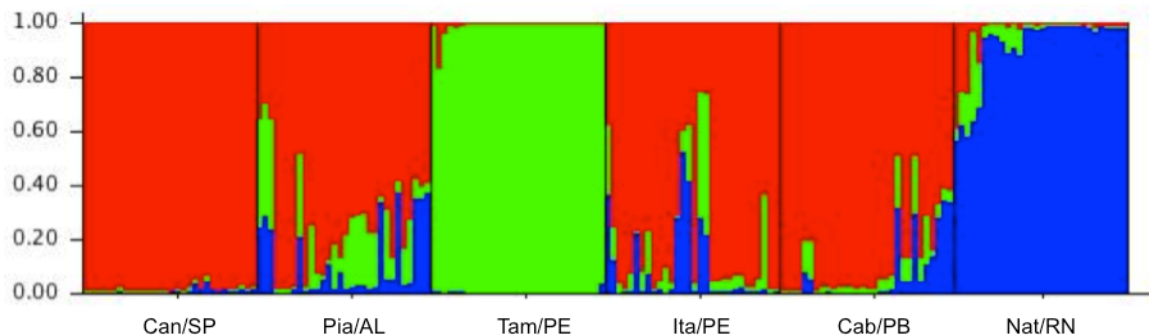


FIGURA 3.09. Estruturação bayesiana mostrando a existência de três populações ($K = 3$) para as amostras das seis localidades de *Mugil curema* estudadas. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto.

A análise de variância molecular (AMOVA) para todas as espécies em um único conjunto, demonstrou que 56,91% da variação total encontra-se dentro das populações e 43,09% entre as populações, com um índice de fixação (F_{ST}) igual a 0,43 (TABELA 3.VI). Na AMOVA, cuja estrutura testada foi *M. curema* em um grupo e as demais espécies em outro, foi também observado que a maior variação está dentro das populações (49,91%), seguida pela variação entre as populações dentro dos grupos (35,84%) e índices de fixação F_{ST} igual a 0,147, F_{SC} igual a 0,42 e F_{CT} de 0,5 (TABELA 3.VII). Na AMOVA, apenas com os indivíduos de *M. curema* em um único grupo, a maior fonte de variação foi novamente dentro das populações (59,8% da variação total) com F_{ST} igual a 0,402 (TABELA 3.VIII).

TABELA 3.VI. Análise de variância molecular para as espécies de *Mugil* em um único grupo.

Fontes de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual da variação
Entre os grupos	8	1.281,758	750,223 Va	43,09
Dentro das populações	180	1.783,300	990,722 Vb	56,91
Total	188	3.065,058	1740,945	
Índice de fixação	F _{ST}	0,43093		

Nota: g.l. = Graus de Liberdade.

TABELA 3.VII. Análise de variância molecular para as espécies de *Mugil* divididas em dois grupos. Grupo 1: *M. curema*; Grupo 2: *M. hospes*, *M. liza* e *M. platanus*.

Fontes de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual da variação
Entre os grupos	1	91,397	2,9708 Va	14,75
Entre as populações dentro dos grupos	7	1.190,361	7,18597 Vb	35,84
Dentro das populações	180	1.783,300	9,90722 Vc	49,41
Total	188	3.065,058	20,05027	
	F _{SC}	0,42040		
Índices de fixação	F _{ST}	0,50588		
	F _{CT}	0,14748		

Nota: g.l. = Graus de Liberdade.

TABELA 3.VIII. Análise de variância molecular para as populações de *Mugil curema* em um único grupo.

Fontes de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual da variação
Entre os grupos	5	1.081,028	686,637 Va	40,2
Dentro das populações	174	1.777,300	1.021,437 Vb	59,8
Total	179	2.858,328	1.708,074	
Índice de fixação	F _{ST}	0,402		

Nota: g.l. = Graus de Liberdade.

Os parâmetros de diferenciação genética interespecífica (G_{ST}) e número de migrantes (N_m ; fluxo gênico) globais foram respectivamente 0,3848 e 0,7993. Na análise pareada desses parâmetros entre as diferentes localidades de coleta de *M. curema*, observou-se que 7 de 15 (46,7%) dos pareamentos entre as localidades apresentaram um G_{ST} moderadamente alto ($0,15 > G_{ST} > 0,25$), os demais pareamentos entre *M. curema* (8; 53,3%) apresentaram valores de diferenciação genética maiores do que 0,25 (TABELA 3.IX). Já em relação ao fluxo gênico (N_m), verificou-se o valor máximo de 2,78 (Natal/RN e Piaçabuçu/AL) e o valor mínimo de 0,53 (Tamandaré/PE e Cananéia/SP). Em relação à amostra do estuário do rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP) foram constatados os menores valores referentes ao fluxo gênico histórico (N_m), à exceção da comparação com a amostras do estuário do rio São Francisco (Piaçabuçu/AL) que indicou N_m maior do que 1, a localidade com a menor distância de Cananéia/SP em relação as demais localidades (TABELA IX). Já o N_m entre as espécies do gênero sempre incidiram valores baixos: 0,68 (*M. curema* de Piaçabuçu/AL o e *M. platanus*) e zero (*M. hospes* e *M. liza*) (TABELA 3.IX).

TABELA 3.IX. Valores de G_{ST} (acima da diagonal) e N_m (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas das seis localidades de *M. curema* e das demais três espécies de *Mugil* analisadas. Para siglas consulte a Tabela 3.V e o texto.

		G _{ST}								
		Can/SP	Pia/AL	Tam/PE	Ita/PE	Cab/PB	Nat/RN	M. hospes	M. liza	M. platanus
Nm	Can/SP	--	0,318	0,487	0,339	0,382	0,382	0,646	0,63	0,616
	Pia/AL	1,073	--	0,223	0,186	0,222	0,153	0,544	0,529	0,423
	Tam/PE	0,527	1,74	--	0,316	0,3	0,211	0,766	0,75	0,677
	Ita/PE	0,977	2,192	1,081	--	0,26	0,21	0,558	0,571	0,501
	Cab/PB	0,811	1,757	1,169	1,423	--	0,217	0,582	0,605	0,524
	Nat/RN	0,811	2,776	1,866	1,885	1,8	--	0,52	0,565	0,477
	M. hospes	0,274	0,419	0,153	0,396	0,359	0,462	--	1	0,917
	M. liza	0,293	0,445	0,167	0,376	0,327	0,385	0	--	0,884
	M. platanus	0,312	0,682	0,239	0,498	0,454	0,548	0,045	0,065	--

O teste da repetibilidade apresentou resultados entre 0,993 (coordenada x12, x13 e x14) e 0,998 (coordenadas x1 e x2) (TABELA 3.X), demonstrando que a marcação dos LMs foi precisa.

TABELA 3.X. Resultado do teste de repetibilidade das coordenadas cartesianas dos 17 LMs.

Coordenada	Rep	Coordenada	Rep
x1	0,998	y1	0,996
x2	0,998	y2	0,996
x3	0,997	y3	0,995
x4	0,995	y4	0,995
x5	0,996	y5	0,996
x6	0,995	y6	0,996
x7	0,996	y7	0,996
x8	0,995	y8	0,996
x9	0,994	y9	0,997
x10	0,994	y10	0,997
x11	0,994	y11	0,997
x12	0,993	y12	0,997
x13	0,993	y13	0,997
x14	0,993	y14	0,996
x15	0,994	y15	0,996
x16	0,994	y16	0,996
x17	0,995	y17	0,995

Na análise de discriminantes canônicas, entre as espécies do gênero *Mugil*, evidenciou-se a existência de 4 variáveis. Tais diferenças são congruentes com visualização das grades de deformações. Na análise gráfica, entre a primeira e segunda variável foi possível detectar diferenças claras entre *M. curema* de *M. hospes*, e *M. platanus* e *M. liza* como um único grupo. Já a diferenciação entre *M. platanus* e *M. liza* só foi possível na comparação entre a primeira e a quarta variável canônica (FIGURA 3.10).

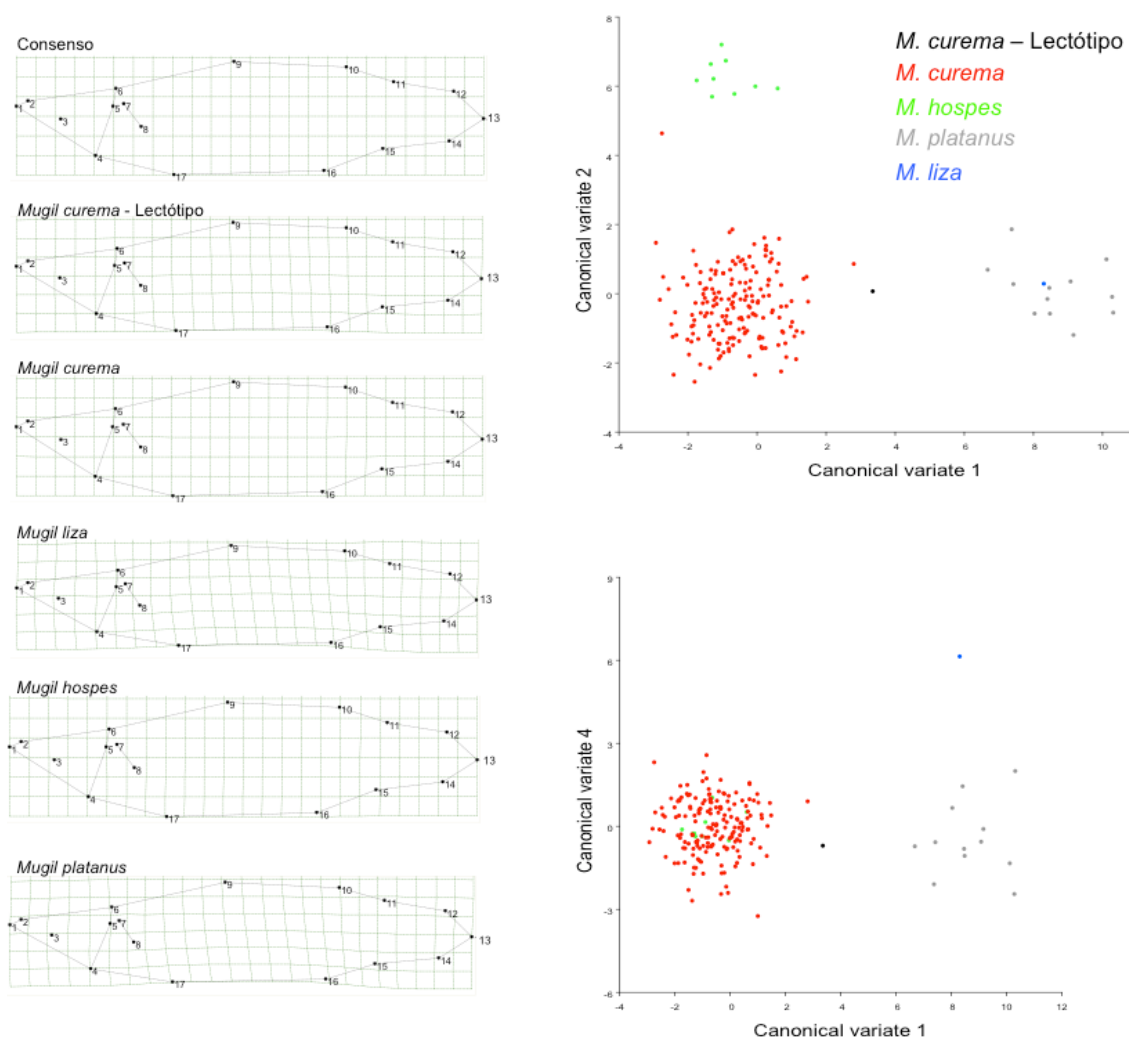


FIGURA 3.10. Gráficos das variáveis canônicas para os indivíduos do gênero *Mugil*. A Esquerda grades de deformação das espécies do gênero, do individuo consenso e do Lectótipo de *Mugil curema*, todos pela variável canônica 1.

Na análise das discriminantes canônicas, apenas entre os indivíduos de *Mugil curema*, foram obtidas seis variáveis canônicas. Não foi possível detectar diferenças morfológicas entre os espécimes provenientes de do estuário dos rios Potengi (Natal/RN), Paraíba do Norte (Cabedelo/PB) e Formoso (Tamandaré/PE) e o lectótipo da espécie. Desse grupo, é possível verificar diferenças morfométricas entre os indivíduos provenientes do estuário do Canal de Santa Cruz (Itamaracá/PE) e dos rios São Francisco (Piaçabuçu/AL) e Ribeira de Iguape (Cananéia/SP).

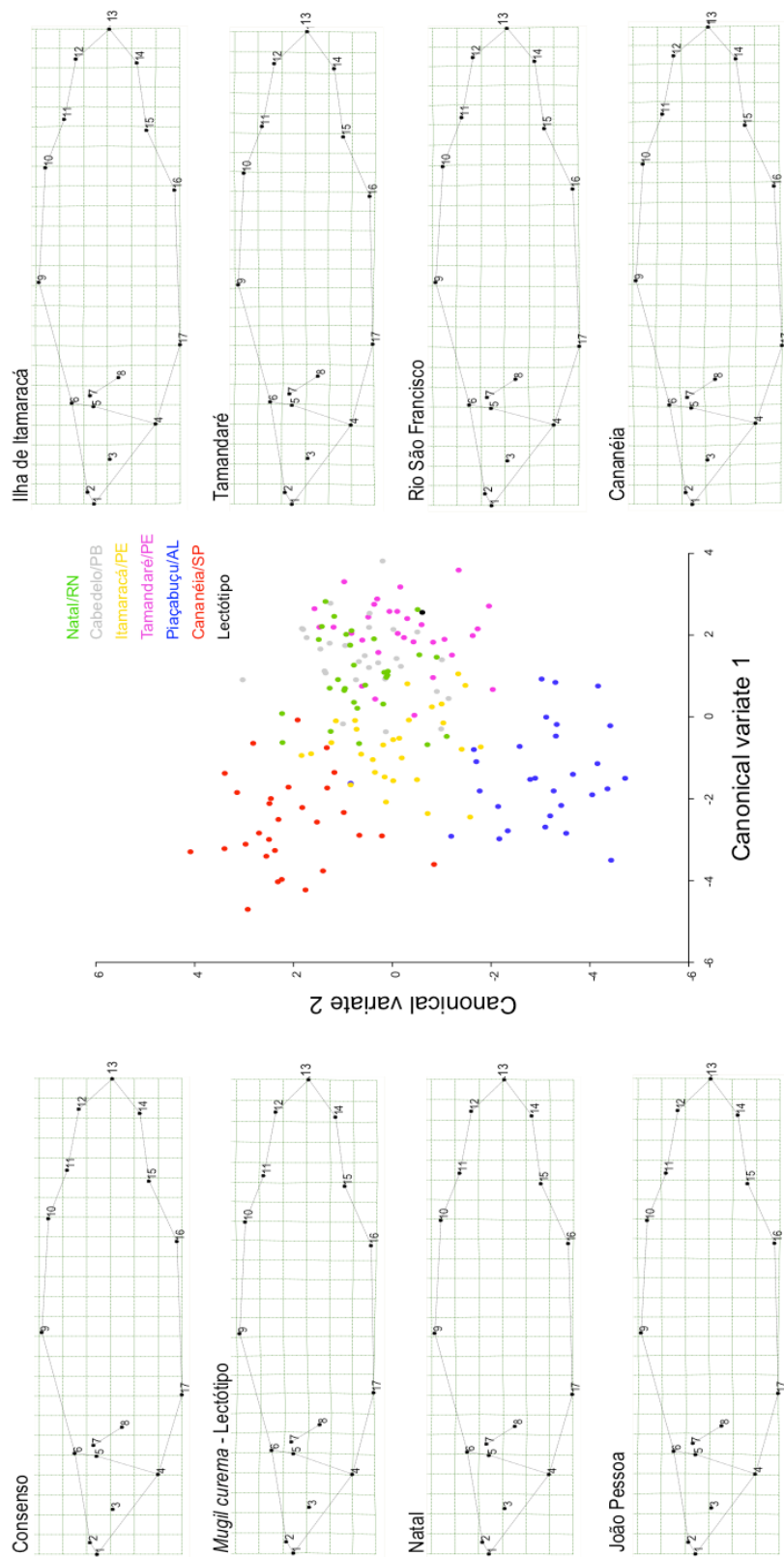


FIGURA 3.11. Gráficos das variáveis canônicas para os indivíduos das seis populações de *Mugil curema*. As grades de deformação das populações, do indivíduo consenso e do Lectótipo de *M. curema*, todos pela variável canônica 1.

Na comparação entre os tamanhos dos centróides das populações, foi possível notar algumas diferenças, quando realizada a ANOVA. Os indivíduos dos estuários dos rios São Francisco (Piaçabuçu/AL) e do canal de Santa Cruz (Itamaracá/PE) foram os que apresentaram as maiores diferenças em relação a todas as outras populações. As maiores similaridades podem ser observadas entre os espécimes do estuário do rio Potengi (Natal/RN) com aqueles dos rios Ribeira de Iguape (Cananéia/SP) e Paraíba do Norte (Cabedelo, PB) e este últimos com aqueles do estuário do rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP) (TABELA 3.XI).

TABELA 3.XI. ANOVA do tamanho do centróide entre as populações de *Mugil curema* coletadas ao longo da costa do Brasil. Para siglas consulte a Tabela V e o texto.

	Can/SP	Pia/AL	Tam/PE	Ita/PE	Cab/PB	Nat/RN
Can/SP	1,000					
Pia/AL	0,000	1,000				
Tam/PE	0,603	0,000	1,000			
Ita/PE	0,000	0,063	0,000	1,000		
Cab/PB	0,974	0,002	0,166	0,000	1,000	
Nat/RN	1,000	0,000	0,527	0,000	0,986	1,000

3.5. DISCUSSÃO

Variabilidade genética e o status de conservação de Mugil curema.

A biologia da conservação tem como um dos cernes principal a conservação da diversidade biológica, em seus diversos níveis (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Para tanto, deve-se entender sobre os processos que governam essa diversidade, suas particularidades caso a caso, para assim poder conceber estratégias praticas de conservação (MORITZ, 2002). Uma das formas de prover subsídios para tais estratégias é quantificar e avaliar, entre os indivíduos e populações, a variabilidade e a estrutura genética (SOLÉ-CAVA, 2001), assim como a sua variabilidade morfológica.

Os dados relativos aos marcadores ISSRs mostraram altos níveis de diversidade genética global em *Mugil curema* (100%). Estes dados sugerem que apesar da exploração intensa, a população ainda apresenta um bom estado de conservação em termos globais. Porém, foi observada uma ampla variação na diversidade genética entre as localidades de *M. curema* e (44,44% - 89,61%; TABELAS 3.III e 3.IV). A menor diversidade genética (44,44%) foi observada entre os indivíduos do estuário do rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP). Esta evidência sugere que esta baixa variabilidade pode ser o resultado de dois fenômenos: (a) a ocorrência de um gargalo populacional devido às oscilações dos níveis do mar no intervalo entre 120.000 e 7.500 anos (MARTIN *et al.*, 1986; SUGUIU *et al.*, 2005), reduzindo as áreas estuarinas em episódios de retração do nível do mar e, (b) aumento acentuado da exploração de Mugilideos (exemplares maiores), modificando perfis biológico-populacionais nos últimos anos (IBAMA, 2008). Informações adicionais em termos pesqueiros ainda relatam

que este recurso esta em sobrepesca desde a década de 80 (MENDONÇA; BONFANTE, 2011), o que pode estar contribuindo ainda mais para diminuir a diversidade genética local. Esta baixa diversidade genética sugere uma atenção especial para a conservação da população de *M. curema* do estuário do rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP), uma vez que, diante da variação observada, o potencial adaptativo da espécie está perto de atingir níveis críticos, tal com aquele observado em outras espécies de peixes exploradas na região Neotropical, tanto na água doce com também no ambiente marinho [Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (27%); Matrinchã, *Brycon lundii* (34,7%); Mero, *Epinephelus itajara* (23,2%)] (SEKINE *et al.*, 2002; WASKO; GALETTI, 2002; SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Coesão genético-evolutiva das populações de Mugil curema.

Os exemplares de *M. curema* do estuário do rio Ribeira de Iguape (Cananéia/SP) compreendem a amostra com a maior distância geográfica das demais localidades acessadas (TABELA 3.V). Assim, seria consistente imaginar uma possibilidade de isolamento do contingente desta localidade. A análise de similaridade genética (NJ), bem com a evolutiva por máxima parcimônia apoiam tal hipótese dado que ambas as topologias indicam esta amostra como uma unidade genética/filogenética singular. Os dados obtidos de diferenciação genética (G_{ST} ; TABELA 3.IX) reforçam evolutivamente tal isolamento, uma vez que todos o valores observados estão acima de 0,3, o que indica diferenciação genética muito alta (HARTL; CLARCK, 2010). Além disso, a análise de estruturação bayesiana e a morfometria geométrica pela variável canônica 2 (FIGURAS 3.09 e 3.11) reiteram a condição de isolamento desta amostragem, sugerindo como uma unidade

populacional particular e prioritário de conservação. Tal condição de priorização se sustenta em duas evidências: (1) a baixa variabilidade genética observada e (2) a estruturação genética e morfológica observada. Porém, a topologia de NJ permite sugerir uma possibilidade de resgate genético, em termos da recuperação desta população. A topologia de NJ e parcialmente a topologia de MP indicaram um relacionamento genético-evolutivo entre a amostra do rio Ribeira de Iguape (Cananéia, SP) e aquele do estuário do rio São Francisco (Piaçabuçu, AL). Tal relacionamento permite concluir que, pelo menos parcialmente, a população de Piaçabuçu/AL tem papel fundamental na demografia histórica da população de Cananéia.

A tendência de estruturação populacional em *M. curema* parece não ser apenas capitaneada pelo fenômeno descrito acima para a população de Cananéia. Tal fenômeno pôde ser ainda detectado similarmente nas amostras populacionais dos estuários do Canal de Santa Cruz (Ilha de Itamaracá, PE) e Paraíba do Norte (Cabedelo, PB), segundo as topologias de NJ e MP (FIGURAS 3.06 e 3.07). Segundo ALBIERI *et al.* (2010) as populações de *M. curema* do Rio de Janeiro/RJ e da Venezuela estariam estruturadas devido à distância geográfica entre estas áreas. Porém, as populações aqui estudadas e acima mencionadas compreendem exemplos de maiores e menores distanciamentos geográficos. Este achado está em desacordo com a hipótese de isolamento por distância, uma vez que a análise de correlação de Spearman (FIGURA 3.07) indicou ausência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. Portanto, os dados aqui obtidos argumentam em favor de uma hipótese não geográfica para o isolamento, mas sim como resultado de um fenômeno filopátrico de recrutamento autóctone de larvas. Fenômenos de fidelidade local de larvas e adultos de diversas espécies de peixes já foram propostos na literatura (PEREIRA *et al.*, 2009; FAUVELOT; BORSA, 2011; HAYDEN *et al.*, 2011; JORGENSEN *et al.*, 2012), inclusive em *M. curema* (SILVA,

2007), apesar de um comportamento reprodutivo da espécie caracterizado por agregações reprodutivas em alto mar e fase larval extensa, além da capacidade natatória dos adultos. Dessa forma, sugere-se que *M. curema* na costa do Brasil não é uma única população panmítica e sim uma população formada por metapopulações (*sensu* HANSKI; SIMBERLOFF, 1997), uma vez que também são verificados níveis de fixação altos, indicando forte estruturação entre as populações (TABELAS 3.VI, 3.VII e 3.VIII). Esta união de evidências sugere a necessidade de um melhor entendimento sobre a dinâmica das correntes marinhas costeiras no Brasil, já que tais circunstâncias hidrológicas podem influenciar no relacionamento entre as populações de organismos com dependência ontogenética de zonas estuarinas (SAINT-PAUL; BARLETTA, 2010.).

A diferenciação genético-evolutiva entre as populações de *M. curema* ao longo do litoral brasileiro vem se tornando mais clara. Os altos valores de fixação intraespecífica da diversidade genética entre os grupos, assim como o patamar de proporção de variação (F_{CT}) entre grupos e entre as populações dentro dos grupos (F_{SC}), corroboram a ideia de forte estruturação genética (TABELA VII). O resultado da AMOVA (TABELA VIII), aliados aos de dados de distância genética, variabilidade genética interespecífica (global e pareados) (G_{ST}), similaridade genética (NJ), inferência filogenética (MP) e estruturação Bayesiana fortalecem a ideia de que *M. curema*, ao longo de sua distribuição, é composta por pelo menos três unidades evolutivas distintas (NIRCHIO *et al.*, 2005; FRAGA *et al.*, 2007; AURELLE *et al.*, 2008; HERAS *et al.*, 2009; DURAND *et al.*, 2012), que ocorrem em alguns casos em simpatria. Este cenário de descontinuidade evolutiva é recorrente também para outras espécies do gênero como *Mugil cephalus* LINNAEUS, 1758 (AURELLE *et al.*, 2008; HERAS *et al.*, 2009; JAMANDRE *et al.*, 2009;; SHEN *et al.*, 2011; WHITFIELD *et al.*, 2012; DURAND *et al.*, 2012) e *Mugil incilis* HANCOCK, 1830 (HETT *et al.*,

2011). Essa descontinuidade evolutiva ou espécies crípticas sob a mesma designação taxonômica não é nenhuma surpresa considerando a morfologia externa altamente conservada entre as espécies da família (THOMSON, 1997). Possivelmente, os fenômenos paleoclimáticos mais recentes, como as intensas flutuações térmicas do período Quaternário, tenham boa influência sobre a estrutura das populações de um grupo de peixes muito dependentes de regiões costeiras como Mugilideos. Tais oscilações podem ter reduzido áreas de vida, promovendo gargalos demográficos e favorecendo as consequências populacionais para um regime de deriva genética.

A diferenciação morfológica entre as distintas populações de *M. curema* é sutil. Nas grades de deformações morfológicas praticamente não é possível observar nenhuma grande diferença. Só é possível verificar diferenças entre algumas populações na análise de discriminantes canônica, se as populações forem observadas pareadamente, como mencionado anteriormente. Sendo possível observar que os indivíduos dos de Natal/RN, Cabedelo/PB e Tamandaré/PE, possuem semelhanças morfológicas com o Lectótipo da espécie, tais semelhanças entre os indivíduos dessas localidades podem ser observadas também na análises genética de distancia genética, G_{ST} e N_m , além do NJ e MP. As maiores diferença observadas ocorreram nos tamanhos dos centróides, mostrando principalmente, assim como a distância genética pareada, o NJ e a MP já revelaram novamente, que os indivíduos de Itamaracá/PE possuem um grau de diferenciação mais acentuado quando comparado com as outras localidades, podendo ser definidos como uma unidade evolutiva com mais clareza. Se em populações de *M. curema*, separadas a pelo menos 3 milhões de anos apresenta mínimas diferenças em um contexto morfológico (IBÁÑEZ-AGUIRRE *et al.*, 2006), no ambiente marinho diferenças genéticas sem diferenças morfológicas é um evento recorrente (TAYLOR; DODSON 1994; BOWEN *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2006).

Dinâmica evolutiva em Mugil curema como instrumento para uma pesca sustentável da espécie.

A diversidade genética entre as populações dos diferentes estuários obtidos a partir dos marcadores ISSRs permitem concluir que *M. curema*, apesar do incremento das capturas (LESSA *et al.* 2006; IBAMA, 2008), possuem um boa condição de conservação ao longo da área estudada, tendo em vista o patamar de diversidade genética observada (63-76%), à exceção das populações dos rios Ribeira de Iguape (Cananéia, SP) e Formoso (Tamandaré, PE) que apresentaram os menores índices de diversidade (31 e 44%). Estes resultados auxiliam nas medidas de manejo e gestão, permitindo manter o patamar de exploração dos estuários rios Potengi (Natal, RN), Paraíba do Norte (Cabedelo, PB), Canal de Sta. Cruz (Itamaracá, PE) e São Francisco (Piaçabuçu, AL). Também recomenda-se uma redução de exploração nos estuários dos rios Ribeira de Iguape (Cananéia, SP) e Formoso (Tamandaré, PE), objetivando a recuperação do potencial adaptativo (resgate genético), até que os níveis de diversidade genética da espécie alcançasse patamares similares àquelas observados nas demais localidades analisadas.

Já os padrões de conexão histórica das populações de *M. curema* entre os estuários acessados permite a conclusão de que *Mugil curema* constitui uma única unidade genética perante o agrupamento por Neighbor-joining, compreendendo quatro outras unidades genéticas menores [rios Formoso (Tamandaré, PE), Ribeira de Iguape (Cananéia, SP), Paraíba do Norte (Cabedelo, PB) e Canal de Santa Cruz (Itamaracá, PE)]. Tais resultados indicam que a renovação de cada uma destas populações depende de si mesma, tendo em vista que a variação genética é estuário-específica. Portanto, larvas oriundas de adultos de determinada localidade

tendem ao recrutamento nos mesmos estuários, resultado congruente ao de SILVA (2007). Estes dados sugerem que as medidas de manejo relativos à gestão pesqueira desta espécie demandam ações independentes. Entre as medidas a serem estabelecidas seria a suspensão da captura de indivíduos jovens (saúna) e um tamanho mínimo de captura, condizente com a maturidade reprodutiva dos exemplares (FONTELES-FILHO, 2011).

Os resultados de agrupamentos evolutivos (MP), da simulação Bayesiana e aqueles de fluxo gênico (N_m) indicam que as populações do estuário do rio São Francisco (Piaçabuçu, AL) Formoso (Tamandaré, PE) e ribeira de Iguape (Cananéia, SP) são menos estruturadas que as demais. Apresentam uma miscigenação, principalmente a partir de Piaçabuçu/AL, que fornece diversidade genética aos estuários adjacentes (PINEDA *et al.*, 2007), tal informação mostra que a depauperação da população de Piaçabuçu/AL poderia comprometer às de Tamandaré e de Cananéia. Dessa forma é sugerido que medidas de manejo sejam criadas especificamente em Piaçabuçu/AL para proteger o local doador de diversidade (HARRISON *et al.* 2012), assim estaria possibilitando um aumento da diversidade nos estuários com as menores diversidades genéticas verificadas (em Tamandaré e Cananéia). Entretanto só seria possível apresentar uma ação de manejo baseado no modelo de “fonte-sumidouro” (Suorcer and Sink) de Pulliam (1988), se: (1) abordagens relacionada às dinâmicas de todas essas populações estivessem disponíveis (HANSEN, 2011); (2) se as populações comentadas acima não possuísssem grandes distâncias, que impossibilitaria o movimento direto dos indivíduos entre as localidades (CERQUEIRA *et al.*, 2003), uma vez que a dispersão entre as áreas é possível, mas não a migração de uma tainha de Piaçabuçu para Cananéia ou ao contrário.

De maneira geral, as populações de *M. curema* apresentam diferenças biológicas e ecológicas (MARIN; DODSON, 2000; MARIN *et al.*, 2003; SOLOMON; RAMNARINE, 2007; SILVA, 2007; ALBIERI *et al.*, 2010), que normalmente são atribuídas apenas à variações das condições climáticas, oceanográficas e latitudinais, mas não são analisadas em um contexto evolutivo mais amplo. Evidências de pelo menos três grupos distintos em *Mugil curema*, como as evidenciadas nesses trabalhos e em LEGRANDE; FITZSIMONS (1976), NIRCHIO; CEQUEA (1998) NIRCHIO *et al.* (2003), NIRCHIO *et al.* (2005), HARRISON *et al.* (2007), FRAGA *et al.* (2007), AURELLE *et al.* (2008), HERAS *et al.* (2009) e DURAND *et al.* (2012) podem ser analisadas conjuntamente com as informações biológicas e ecológicas, para assim ser possível estabelecer as unidades de manejo, tão importantes para a conservação desse tradicional recurso pesqueiro.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo indicaram que *Mugil curema* apresenta uma estruturação populacional conspícua ao longo dos estuários analisados. A morfometria geométrica confirmou que os indivíduos dos estuários de Natal/RN, Cabedelo/PB e Tamandaré/PE assemelham-se ao tipo da espécie. Já os dados do genoma mitocondrial, como do genoma nuclear evidenciaram que esta espécie apresenta altos níveis de distinção entre suas unidades evolutivas, no mínimo três unidades distintas. A distribuição destas unidades não está relacionada com a distância geográfica entre os estuários e podem ocorrer isoladas ou em simpatria. Ficou certo também que, principalmente, a população de Itamaracá apresenta um comportamento filopátrico. Pela observação conjunta dos resultados, é possível concluir que *M. curema* não é formada por uma única população panmítica e sim por metapopulações que interagem umas com as outras.

Os níveis encontrados de distinção entre as populações indicam a possibilidade de uma diversidade oculta para *M. curema*. Uma análise cladística mais extensa, agregando indivíduos de outras localidades, poderá elucidar melhor a suspeita de que essa espécie na verdade é formada por um complexo de espécies.

O patamar de diversidade genética, verificado globalmente neste trabalho e em cada estuário, indica que, de maneira geral, o recurso pesqueiro ainda possui uma boa condição de conservação ao longo da área estudada, à exceção das populações de Cananéia e Tamandaré. Entretanto, um melhor cenário para a conservação desse importante recurso pesqueiro tradicional, nesses estuários, pode ser alcançado por ações locais de regulação pesqueira, mas também com uma ação integrada com o estuário do Rio São Francisco.

Em virtude do que foi mencionado, percebe-se que apesar da intrincada estruturação das populações de tainha, de suas relações de conectividade, seu patamar de diversidade e dos demais resultados obtidos é possível vislumbrar um panorama favorável para a conservação das populações. Entretanto a devida atenção deve ser dada para que esse frágil cenário não se altere, o que pode acontecer em pouquíssimo tempo se não houver nenhum tipo de controle por parte os órgãos estatais responsáveis. Ações futuras, que facilitem a correta identificação das diferentes populações de *M. curema*, permitirão que medidas mais eficazes sejam tomadas para o melhor manejo e conservação deste recurso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111:47–55. 2000.
- ALARCÓN, M. C. S. Ecologia reprodutiva da tainha *Mugil platanus* (Günther, 1880) do estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Tese de mestrado. Universidade do Rio Grande, Brasil. 66 p. 2002.
- ALBIERI, R. J.; ARAÚJO, F. G.; RIBEIRO, T. P. Gonadal development and spawning season of white mullet *Mugil curema* (Mugilidae) in a tropical bay. *J. Appl. Ichth.* 26, 105-109.2010.
- ALCÁNTARA, M. R. Breve revisión de los marcadores moleculares *In*: EGUIARTE, L. E.; SOUZA V.; AGUIRRE, X. (Comp.). Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México, D.F. 592p. 2007.
- ALVARADO-BREMER, J. R.; FRISK, M. G.; MILLER, T. J.; TURNER, J.; VINÃS, J.; KWIL, K. Genetic identification of cryptic juveniles of little skate and winter skate. *Journal of Fish Biology* 66, 1177-1182. 2005. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00664.x
- AMORIM, D. S. *Fundamentos de Sistemática Filogenética*. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 156 p. 2002.
- ANDERSON, W. W. Early development, spawning, growth, and occurrence of the silver mullet (*Mugil curema*) along the South Atlantic Coast of the United States. *Fishery Bulletin* 119(57): 397-414. 1957.

- ARCHAK, S.; GAIKWAD, A. B.; GAUTAM, D.; RAO, E. V. V. B.; SWAMY, K. R. M.; KARIHALOO, J. L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46:362-369. 2003.
- ARDURA, A.; POLA, I. G.; LINDE, A. R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA-based methods for species authentication of Amazonian commercial fish. *Food Research International* 43, 2295-2302. 2010. doi: 10.1016/j.foodres.2010.08.004
- ARIAS M. C. INFANTE-MALACHIAS M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA, in: Mاتيoli F.M.C.F. (Ed.), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos Editora, Ribeirão Preto, pp. 143-152. 2001.
- AURELLE, D.; BARTHELEMY, R.-M.; QUIGNARD, J.-P.; TRABELSI, M.; FAURE, E. Molecular Phylogeny of Mugilidae (Teleostei: Perciformes). *The Open Marine Biology Journal* 2, 29-37. 2008. doi: 10.2174/1874450800802010029
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94, 184-193. 2007.
- BEKTASM Y.; BELDUZ, A. O. PCR based identification and discrimination of *Caranx rhonchus* (Pices, Carangidae) based on nuclear and mtDNA sequences. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 518-525. 2009.
- BIZERRIL, C. R. S. F.; COSTA, P. A. S. *Peixes marinhos do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro. Fundação de Estudos do Mar - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro.

p. 233, 2001.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T., (Ed.) *Marcadores moleculares*. Viçosa, MG: UFV, 2006

BOTSFORD, L.; HASTINGS, A.; GAINES, S. D. Dependence of sustainability on the configuration of marine reserves and larval dispersal distance. *Ecology Letters* 4. 144-150. 2001.

BOWEN, B. W.; A. L. BASS, A. L.; ROCHA, L. A.; GRANT, W. S.; ROBERTSON, D. R. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution*, 55(5): 1029–1039. 2001.

BOWEN, B. W.; GRANT, W. S. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*, 51(5): 1601-1610.1997.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science* 3, 471-508. 2011. doi: 10.1146/annurev-marine-120308-080950

BUI, A. O. V.; CASTONGUAY, M.; OUELLET, P.; SÉVIGNY, J-M. Searching for Atlantic cod (*Gadus morhua*) spawning sites in the northwest Gulf of St Lawrence (Canada) using molecular techniques. *ICES Journal of Marine Science* 68, 911-918. 2011. doi: 10.1093/icesjms/fsr016

BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA Barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of Skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists' Society* 61(3), 138–153. 2007.

- CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular.. In: Sérgio R. Mاتيoli. (Org.). *Biologia Molecular e Evolução*. 1ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 51-63. 2001.
- CALENDINI, F.; MARTIN, J. F. PaupUp v1.0.2032.22590 Beta. A free graphical frontend for Paup* DOS software. 2005.
- CALVO, M.; TEMPLADO, J.; OLIVERIO, M.; MACHORDOM, A. Hidden Mediterranean biodiversity: molecular evidence for a cryptic species complex within the reef building vermetid gastropod *Dendropoma petraeum* (Mollusca: Caenogastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 898–912. 2009. doi: 10.1111/j.1095-8312.2008.01167.x
- CERQUEIRA, R.; BRANDT, A.; NASCIMENTO, M. T.; PARDINI, R. Fragmentação: alguns conceitos. In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. (orgs.). *Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*. Brasília: MMA/SBF, p. 24-40. 2003.
- CHENG, Q-Q.; LU, D-R. PCR-RFLP analysis of *cytochrome b* gene does not support *Coilia ectenes taihuensis* being a subspecies of *Coilia ectenes*. *Journal of Genetics* 84, 307-310. 2005.
- CLARK, G. M. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. *Acta Zoologica Fennica* 191, 31 - 36. 1992.
- CORONEL, J. S.; MAES, J. E.; CLAUS, S.; VANDAMME, P. A.; VOLCKAERT, F. A. M. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *J. Fish Biol.* 65(3): 859-868. 2004.

- COWEN, R. K.; GAWARKIEWICZ, G.; PINEDA, J.; THORROLD, S. R.;
WERNER, F. R. Population connectivity in marine systems.
Oceanography, 20(3): 14-21. 2007.
- COWEN, R. K.; LWIZA, K. M. M.; SPONAUGLE, S.; PARIS, C. B.;
OLSON, D. B. Connectivity of marine populations: open or
closed? *Science* 287, 857–859. 2000.
- COWEN, R. K.; PARIS, C. B.; SRINIVASAN, A. Scaling of connectivity
in marine populations. *Science* 311: 522–527. 2006.
- COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine
population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1,
443–466. 2009.
- 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. How many species of goliath grouper
are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine
fish and the resurrection of a geopolitical species.
Endangered Species Research 7, 167-174. 2009. doi:
10.3354/esr00117
- D'ANATRO, A.; LESSA, E. P. Phenotypic and genetic variation in the
white croaker *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823
(Perciformes: Sciaenidae): testing the relative roles of
genetic drift and natural selection on population divergence.
Journal of Zoology, 285: 139–149. 2011. doi:
10.1111/j.1469-7998.2011.00823.x
- DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity:
taxonomy, species delimitation and DNA barcoding.
*Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological
Sciences*, 360: 1905-1916, 2005.

- DURAND, J-D.; SHEN, K. N.; CHEN, W. J.; JAMANDRE, B. W.; BLEL, H.; DIOP, K.; NIRCHIO, M.; GARCIA DE LEÓN, F. J.; WHITFIELD, A. K.; CHANG, C.-W.; BORSAL, P. Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64(1): 73–92. 2012
- DWIVEDI, A. K.; DUBEY, V. K. Advancements in morphometric differentiation: a review on stock identification among fish populations. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (online) 2012. doi: 10.1007/s11160-012-9279-1
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567. 2010. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATRO J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491. 1992.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked Loci and correlated allele frequencies. *Genetics*; v. 164, p.1567–1587. 2003.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 4(7): 574–578. 2007.
- FAO, Statistical databases. Disponível em: <HTTP://www.fao.org>. 2011. Acesso em: fev. 2011.

- FAUVELOT, C.; BORSA, P. Patterns of genetic isolation in a widely distributed pelagic fish, the narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 886-902. 2011. doi:10.1111/j.1095-8312.2011.01754.x
- FAVERO, J. M. Ictiofauna de ambientes praias da barra sul do sistema costeiro Cananéia-Iguape, São Paulo. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 174 p. 2011.
- FERNANDEZ-TAJES, J.; MÉNDEZ, J. Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 7278-7282. 2007. doi: 0.1021/jf0709855
- FERREIRA, L. I. 1989. Estudo de aspectos da reprodução de *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Pisces, Mugilidae) no estuário de São Vicente, SP. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 90 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 3. ed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299, 1994.
- FONTELES-FILHO, A. A. Oceanografia, biologia e dinâmica populacional de recursos pesqueiros. Expressão Gráfica e Editora, Fortaleza, CE. 464p. 2011.

- FRAGA, E.; SCHNEIDER, H.; NIRCHIO, M.; SANTA-BRIGIDA, E.; RODRIGUES-FILHO, L. F.; SAMPAIO, I. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology* 23, 598-604. 2007. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00911.x
- FRANCISCO, F. O. *Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão Plebeia remota: análise do DNA mitocondrial e microssatélites*. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 147 p. 2002.
- FRANCO, L.; BASHIRULLAH, K. M. B. Alimentación de la lisa (*Mugil curema*) del golfo de Cariaco-Estado Sucre, Venezuela. *Zootec. trop.*, 10(2): 219-238. 1992.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de *Genética da Conservação*. SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA. 259p. 2008.
- FUNDAÇÃO PROZEE. *Monitoramento da atividade pesqueira no litoral do Brasil*. Relatório técnico final. Convênio SEAP/PROZEE/IBAMA. 328p. 2006.
- GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S.; HURST, G. D. D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, 4541-4550. 2009. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- GARDENER, J. P. A.; WESTFALL, K. M. Geographic distribution and molecular identification of a metapopulation of blue mussels (genus *Mytilus*) in northeastern New Zealand. *Journal of Molluscan Studies* 78, 66-73. 2012. doi: 10.1093/mollus/eyr037

- GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998-1006. 1994.
- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A.; HEBERT, P. D. N.; HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23: 167-172, 2007.
- HALLERMAN, E.M., Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists, Bethesda: American Fisheries Society, 2003.
- HANSEN, A. J. Contribution of source-sink theory to protected area science. Pgs 339-360 In: LIU, J.; HULL, V.; MORZILLO, A.; WIENS, J. (eds.) *Sources, Sinks, and Sustainability across Landscapes*. Cambridge University Press. 2011.
- HANSKI, I. A.; SIMBERLOFF, D. S. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: HANSKI, I. A.; GILPIN, M. E. (eds). *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution*. Academic Press. San Diego. 1997
- HARRISON, H. B.; WILLIAMSON, D. H.; EVANS, R. D.; ALMANY, G. R.; THORROLD, S. R.; RUSS, G. R.; FELDHEIM, K. A.; HERWERDEN, L. V.; PLANES, S.; SRINIVASAN, M.; BERUMEN, M. L.; JONES, G. P. Larval Export from Marine Reserves and the Recruitment Benefit for Fish and Fisheries. *Current Biology*, 22(11): 1023-1028. 2012. Doi: 10.1016/j.cub.2012.04.008
- HARRISON, I. J.; NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C.; RON, E.; GAVIRIA, J. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from

- Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *Journal of Fish Biology* 71, 76-97. 2007. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01520.x
- HARRISON, I.J., 1995. Mugilidae. Lisas. p. 1293-1298. In W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter and V. Niem (eds.) Guia FAO para Identification de Especies para lo Fines de la Pesca. Pacifico Centro-Oriental. 3 Vols. FAO, Rome.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Princípios de Genética de Populações*. 4^a ed. Editora Artmed: Porto Alegre. 2010.
- HASHIMOTO, D. T.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FOTRSTI, F. 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. 2010. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.015
- HASTINGS, A.; HARRISON, S. Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:167–188. 1994.
- HAUSER, L.; CARVALHO, G. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, v.9, p.333-362. 2008.
- HAYDEN, T. A.; MINER, J. G.; FARVER, J. R.; FRYER, B. J. Philopatry and vagrancy of white bass (*Morone chrysops*) spawning in the Sandusky River: Evidence of metapopulation structure in western Lake Erie using otolith chemistry. *Journal of Great Lakes Research* 37(4): 691-697. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jglr.2011.08.012>

- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. e WAARD, R. D. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270: 313–322, 2003a.
- HEBERT, P. D. N.; DE WAARD, J. R.; LANDRY, J-F. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol. Lett.* 6, 359–362. 2010. doi:10.1098/rsbl.2009.0848
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101, 14812-14817. 2004. doi: 0.1073/pnas.0406166101
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings Biological Sciences*, 270,:96-99. 2003b.
- HERAS, S.; CASTRO, M. G.; ROLDÁN, M. I. *Mugil curema* in Argentinean waters: Combined morphological and molecular approach. *Aquaculture* 261: 473-478. 2006.
- HERAS, S.; ROLDÁN, M. I.; CASTRO, M. G. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 217-231. 2009. doi: 10.1007/s11160-008-9100-3
- HETT, A. K.; NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C.; SICCHA, Z. R.; ROSSI, A. R.; SOLA, L. Karyotype characterization of *Mugil incilis* Hancock, 1830 (Mugiliformes: Mugilidae), including a description of an unusual co-localization of major and minor ribosomal genes in the family. *Neotropical Ichthyology*, 9(1): 107-112, 2011.

- HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One* 3:2490, 2008.
- HUBISZ, M. J. D.; FALUSH, D.; STEPHENS M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322–1332. 2009.
- IBAMA, 2008. Estatística da Pesca 2006. Grandes regiões e unidades da federação. 181p.
- IBÁÑEZ-AGUIRRE, A. L.; CABRAL-SOLÍS, E.; GALLARDO-CABELLO, M.; ESPINO-BARR. E. Comparative morphometrics of two populations of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) on the Atlantic and Mexican Pacific coasts. *SCI. MAR.* 70 (1): 139-145. 2006.
- IBÁÑEZ, A. L.; GONZÁLEZ-CASTRO, M.; PACHECO-ALMANZAR, E. First record of *Mugil hospes* in the Gulf of Mexico and its identification from *Mugil curema* using *ctenii*. *Journal of Fish Biology* 78, 386–390. 2011. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02863.x
- ICZN. Opinion 1787. *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier; Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes): specific name conserved. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 51, 286-287. 1994.
- IHERING, R. VON. Dicionário dos Animais do Brasil, p. 195-196. 1940.

- IVANOVA, N. V.; ZEMLAK, T. S.; HANNER, R. H.; HEBERT, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7:544–548, 2007.
- JAMANDRE, B. W.; DURAND J. D.; TZENG, W. N. Phylogeography of the flathead mullet *Mugil cephalus* in the north-west Pacific as inferred from the mtDNA control region. *Journal of Fish Biology* 75, 393-407. 2009. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02332.x
- JORGENSEN, S. J.; REEB, C. A.; CHAPPLE, T. K.; ANDERSON, S.; PERLE, C.; SOMMERAN, S. R. V.; FRITZ-COPE, C.; BROWN, A. C.; KLIMLEY, A. P.; BLOCK, B. A. Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proc. R. Soc. B* 277, 679-688. 2010. doi: 10.1098/rspb.2009.1155
- KANG, S.; SULTANA, T.; LOKTEV, V.; WONGRATANACHEEWIN, S.; SOHN, W. M.; EOM, K. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). *Parasitology international*, 57:191-197. 2008. doi: 10.1016/j.parint.2007.12.007
- KINLAN, B. P.; GAINES, S. D. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspective. *Ecology*, 84:2007-2020. 2003.
- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ. 1.02b ed. Manchester, UK: Faculty of Life Sciences, University of Manchester. 2008.
- LEE, T.; FOIGHIL, D. Ó. Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Molecular Ecology*, 13: 3527-3542. 2004. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02337.x

- LEGRANDE, W. H.; FITZSIMONS, J. M. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *M. cephalus* (Perciformes: Mugilidae) from Louisiana. *Copeia* 1976, 388–391. 1976.
- LEMAIRE, G.; WILKINS, R.; HODGSON, J. Challenges for Grassland Science: managing research priorities. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 108(2): 99-108, 2005.
- LESSA, R.; VIEIRA, A. C. S.; MONTEIRO, A.; SANTOS, J. S.; LIMA, M. M.; CUNHA, E. J.; SOUZA-JR, J. C. A.; BEZERRA, S.; TRAVASSOS, P. E. P. F.; OLIVEIRA, B. A. B. R. Diagnóstico da pesca no litoral do estado de Pernambuco. In *A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais* (ISAAC, V. J.; MARTINS, A. S.; HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETTO FILHO, J. M., eds.), pp. 67-91. Bélem, PA: Editora Universitária UFPA. 2006.
- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 65-66, 2003.
- LIRA, L.; WOR, C.; HAZIN, F. H. V.; BRAGA-JÚNIOR, H. A. C.; DOS SANTOS, J. C. P. Estudos de correntes marinhas por meio do lançamento de cartões de deriva no litoral do estado de Pernambuco, *Brasil. Arq. Ciên. Mar* 43(1): 30-37. 2010.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F.; DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4): 1-37. 2004.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. *Ecological genetics: design, analysis, and application*, Blackwell Publishing, Malden. 2004.
- MALVÁREZ, G.; OLIVEIRA, V. L. A PCR/RFLP technique to

characterize fungal species em *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden ectomycorrhizas. *Mycorrhizas* 13, 101-105. 2003.
doi: 10.1007/s00572-002-0208-3

MARCGRAVE, J. *História natural do Brasil*. Tradução: Museu Paulista-Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, Brasil, 239 pp. 1648.

MARIN, B. J. E.; DODSON, J. J. Age, growth and fecundity of the silver mullet, *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae), in coastal areas of Northeastern Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, v. 48, p. 389–398. 2000.

MARIN, E.; QUINTERO, B. J.; BUSSIÈRE, A. D.; DODSON, J. J. Reproduction and recruitment of white mullet (*Mugil curema*) to a tropical lagoon (Margarita Island, Venezuela) as revealed by otolith microstructure. *Fish. Bull.*, v. 101, p. 809–821. 2003.

MARSHALL, E. Will DNA bar codes breathe life into classification?. *Science*, 307:1037, 2005.

MARTIN, L.; SUGUIO, K. & FLEXOR, J. M. Shell miodens as a source for additional information in Holocene shoreline and sea-level reconstruction: example form the coast of Brazil. *In: Sea-level research: a manual for the collection and evaluation of data*. Ed. by Orson van de Palassche; 18, p.503-523. 1986.

MATHEWS, L.M.; LUKE ADAMS, L; ERICA ANDERSON, E.; BASILE, M.; GOTTARDI, E.; BUCKHOLT, M. A. Genetic and morphological evidence for substantial hidden biodiversity in a freshwater crayfish species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(1): 126–135. 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.006>

MCDONALD, W.; FRY, B.; DEIGHTON, M. Identification of

- Streptococcus spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Veterinary microbiology* 111, 241-246. 2005. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.012
- MCGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A. ; GREYLING, M. M. ; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113, 135–144, 2000.
- MENDONÇA, J. T.; BONFANTE, T. M. Assessment and management of white mullet *Mugil curema* (Valencienne, 1836) (Mugilidae) fisheries of the south coast of São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 71(3): 663-672. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842011000400010>.
- MENEZES, N. A. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do Litoral Brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 2, 1-12 . 1983.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO. J. L. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei (4)*. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 105p. 1985.
- MENEZES, N. A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. An old taxonomic dilemma: the identify of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 2519, 59-68, 2010.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos. 198 p. 1999.
- MORAES, D. A. A. Morfometria geométrica e a "Revolução na Morfometria Geométrica": localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. *Boletim*, ano 3, 2003.

- MORAES, D. A. Evolução morfológica do crânio e elementos pós-cranianos dos marsupiais americanos (Dedelpimorphia, Paucituberculata, Microbiotheria). 2004. 462 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51(2): 238-254. 2002.
- MUTO, N.; KAI, Y.; NAKABO, T. Genetic and morphological differences between *Sebastes vulpes* and *S. zonatus* (Teleostei: Scorpaeniformes: Scorpaenidae). *Fishery Bulletin* 109(4): 429-439. 2011.
- NAGELKERKEN, I. Ecological connectivity among tropical coastal ecosystems. Springer Science and Business Media, Dordrecht, the Netherlands, 615p. 2009.
- NEI, M. Genetic distances between populations. *Nature* 106, 283-292. 1972.
- NELSON, J. S. *Fishes of the world*. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4th edition. 601p. 2006.
- NIRCHIO, M.; CEQUEA, H. Karyology of *Mugil liza* and *Mugil curema* from Venezuela. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 27, 45-50. 1998.
- NIRCHIO, M.; CERVIGÓN, F.; REBELO PORTO, J. I.; PÉREZ, J. E.; GÓMEZ, J. A.; VILLALAZ, J. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. *Scientia Marina* 67, 113-115. 2003.
- NIRCHIO, M.; CIPRIANO, R.; CESTARI, M.; FENOCCHIO, A. S. Cytogenetical and morphological features reveal significant

- differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae). *Neotropical Ichthyology* 3, 107-110. 2005.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35:81–100. 2009. DOI 10.1007/s10695-008-9250-1
- OLIVERIA-NETO, J. F.; PIE, M. R.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; BAGGIO, R. A. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) *Marine Ecology* 28, 460-469. 2007. doi:10.1111/j.1439-0485.2007.00188.x
- PAGE, R. NDE – Nexus data editor for Windows. Software distribuído pelo autor. 1998.
- PAIVA, M. P. Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil. EUFC. Fortaleza. 278p. 1997.
- PALUMBI, S. R. Population genetics, demographic connectivity and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13: 146–158. 2003.
- PAMPOULIE, C.; GYSELS, E. S.; MAES, G. E.; HELLEMANS, B.; LEENTJES, V.; JONES, A. G.; VOLCKAERT, F. A. Evidence for fine-scale genetic structure and estuarine colonization in a potential high gene flow marine goby (*Pomatoschistus minutus*). *Heredity*, 92: 434-445. 2004.
- PAPASOTIROPOULOS, V.; KLOSSA-KILIA, E.; KILIAS, G.; ALAHOTIS, S. Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships in Grey Mulletts (Teleostei: Mugilidae) Based on PCR–RFLP Analysis of mtDNA Segments. *Biochemical Genetics* 40, 71-86. 2002. doi: 0006-2928/02/0400-0071/0

- PARSONS, B. J.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Mol. Breed.* 3 (2):115-125. 1997.
- PATRELLE, C.; OHST, T.; PICARD, D.; PAGANO, A.; SOURICE, S.; DALLAY, M.-G.; PLÖTNER, J. A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources* 11, 200-205. 2011. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02905.x
- PEREIRA, L. H. G., FORESTI, F. AND OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* 18: 215-225. 2009. doi: 10.1111/j.1600-0633.2008.00338.x
- PEREIRA, L. H. G.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA* 22(1): 87-96. 2011. doi:10.3109/19401736.2011.588213
- PÉREZ-ENRIQUEZ, R.; GARCIA-RODRIGUEZ, F. J.; MENDOZA-CARRION, G.; PADILLA, C. Geographical variation in the genetic diversity and composition of the endangered Queen Conch *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae) from Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical* 59, 1115-1126. 2011.
- PESOLE G.; GRISSI, C.; CHIRICO, A. D.; SACCONI, C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48, 427-434. 1999.

- PINEDA, J.; HARE, J. A.; SPONAUGLE, S. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20(3): 22–39. 2007.
- PIORSKI, N. M. A.; SANCHES, A. B.; CARVALHO-COSTA, L. F. C.; HATANAKA, T. B.; CARRILLO-AVILA, M. B.; FREITAS, P. D. D.; GALETTI JR., P. M. B. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Braz. J. Biol.*, 68(4, Suppl.): 1039-1050, 2008.
- POGSON, G. H.; MESA, K. H.; BOUTILIER, R. G. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* 139:375–385. 1995.
- PRIMACK, R.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. Londrina, Editora Vida, 2001.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959. 2000.
- PULLIAM, H. R. Sources, sinks, and population regulation. *American Naturalist*, 132:652–661. 1988.
- RAINA S.N.; RANI V.; KOJIMA T.; OGIHARA Y.; SINGH K.P.; DEVARUMATH R.M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, v.44, n.5, p.763-772, 2001.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364. 2007. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x

- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica, Dordrecht*, 128: 9-17, 2002.
- REHBEIN, H. New Trends in Species Identification of Fishery Products. In *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications* (Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Miyashita K.; Wanasundara U.; eds), pp. 171-180. UK: Wiley-Blackwell, Oxford. 2010. doi: 10.1002/9781444325546.ch14
- ROHLF F. J.; MARCUS L. FA Revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 8(4): 129-132. 1993
- SAINT-PAUL, U.; BARLETTA, M. Utilization of Aquatic Resources along the North Brazilian Coast with Special Reference to Mangroves as Fish Nurseries. In: C T Hoanh, IWMI-SEA, Laos, B Szuster, University of Hawaii, USA, K S Pheng, The Worldfish Centre, Malaysia, A Ismail, International Rice Research Institute, Phillipines, A Noble, IWMI-SEA, Laos. (Org.). *Tropical Deltas and Coastal Zones: Food Production, communities and environmental at the land-water interface..* 1ed.Oxfordshire: GABI, 448-458. 2010.
- SALA-BOZANO, M.; KETMAIER, V.; MARIANI, S. Contrasting signals from multiple markers illuminate population connectivity in a marine fish. *Molecular Ecology*, 18, 4811–4826. 2009. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04404.x
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- SANTACLARA, F.; ESPÍÑEIRA, M.; CABADO, A.; VIEITES, J. Detection of land animal remains in fish meals by the polymerase chain reaction-restriction fragment length

- polymorphism technique. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 305-310. 2007. doi: 10.1021/jf061840l
- SANTOS, S.; HRBEK, T.; FARIA, I. P.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in the Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology*, 15, 4361–4373. 2006.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26(2): 151-161. 2003.
- SAXENA, S.; CHANDRA, R.; SRIVASTAVA, A. P.; MISHRA, M.; PATHAK, R. K.; RANADE, S. A. Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using single primer amplification reaction (SPAR) methods. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80 (3):291-296. 2005.
- SCHUNTER, C.; CARRERAS-CARBONELL, J.; PLANES, S.; SALA, E.; BALLESTEROS, E.; ZABALA, M.; HARMELIN, J-G.; HARMELIN-VIVIEN, M.; MACPHERSON, E.; PASCUAL, M. Genetic connectivity patterns in an endangered species: The dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 40, 126-133. 2011.
- SEKINE, E. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S.; JÚLIO, H. F. JR. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paranaá River. *Acta Scientiarum, Biological Sciences* 24(2): 507–512. 2002.

- SHEN, K-N.; JAMANDRE, B. W.; HSU, C-C.; WANNNIAN TZENG, W-N.; AND DURAND, J-D. Plio-Pleistocene sea level and temperature fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally-distributed flathead mullet *Mugil cephalus*. *BMC Evolutionary Biology* 11, 83. 2011. doi:10.1186/1471-2148-11-83
- SILVA-OLIVEIRA, G. C.; RÉGO, P. S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I; VALLINOTO, M. 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): p.988-994. 2008.
- SILVA, F. M. S. *Biologie, pêche et dynamique de la population de mullet blanc (Mugil curema, Valenciennes, 1836) de Pernambuco – Brésil*. Tese de Doutorado. Brest, Bretagne Occidentale, Fr: Faculté de Sciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale. 2007.
- SINCLAIR, M. Marine Populations: an Essay on Population Regulation and Speciation. University of Washington Press, Seattle. 1988.
- SMITH, P. J.; STEINKE, D.; MCMILLAN, P. J.; STEWART, A. L.; MCVEAGH, S. M.; DIAZ DE ASTARLOA J. M.; WELSFORD, D.; WARD, R. D. DNA barcoding highlights a cryptic species of grenadier *Macrourus* in the Southern Ocean. *Journal of Fish Biology* 78, 355-365. 2010. doi: 0.1111/j.1095-8649.2010.02846.x
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Ribeirão Preto, p.172- 192. 2001.

- SOLOMON, F. N.; RAMNARINE, I. W. Reproductive biology of white mullet, *Mugil curema* (Valenciennes) in the Southern Caribbean. *Fish. Res.*, 88: 133–138. 2007.
- SOWMYA, P.; DHANYA, V.; MADHAVAN, H.; THERESE, K. Comparative efficacy of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP); multiplex PCR for glycoprotein B (gB) genotyping of human cytomegalovirus. *Indian Journal of Medical Research* 126, 122-127. 2007.
- SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R. Identification and differentiation of canine Mycoplasma isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary microbiology* 125, 170-174. 2007. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.045
- SPREITZER, M. L.; MAUTNER, S.; MAKASA, L.; STURMBAUER, C. Genetic and morphological population differentiation in the rock-dwelling and specialized shrimp-feeding cichlid fish species *Altolamprologus compressiceps* from Lake Tanganyika, East Africa, *Hydrobiologia* 682:143–154. 2012. doi: 10.1007/s10750-011-0698-0
- STOECKLE, M.; WAGGONER, P. E.; AUSUBEL, J. H. Barcoding life, illustrated. Goals, rationale, results. Disponível em: www.barcoding.si.edu. 2005.
- SUGUIO, K.; ANGULO, R. J. ; CARVALHO, A. M. ; CORRÊA, I. C. S. ; TOMAZELLI, L. J.; WILLWOCK, J. A.; VITAL, H. Paleoníveis do mar e paleolinhas da costa. In: SOUZA, C. R. G.; SUGUIO, K. ; OLIVEIRA, A. M. S.; OLIVEIRA, P. E. (eds), *Quaternário no Brasil*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2005.
- SWOFFORD, D. L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2002.

- TAYLOR, E. B.; DODSON, J. J. A molecular analysis of relationships and biogeography within a species complex of Holarctic fish (genus *Osmerus*). *Molecular Ecology*, 3, 235–248. 1994.
- TELETCHÉA, T. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews of Fish Biology and Fisheries* 19, 265-293. 2009. doi: 10.1007/s11160-009-9107-4
- TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A. G.; MARRA, P. R. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, 2(2): 87-95. 2001.
- THOMSON, J. M. Mugilidae. In: Fischer W. (Eds). *FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (Fishing Area 31)*. Vol. 3. FAO, Rome. 1978.
- THOMSON, J. M. The Mugilidae of the world. *Memoirs of the Queensland Museum*, 41, 457-562. 1997.
- TORRES, R. A. New frontiers in conservation biology: the era of the genome. *Braz. J. Nature Conservation* 1(2): 60-62. 2003.
- TORRES, R. A.; ROPER, J. J.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Surprising genomic diversity in the Neotropical fish *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): how many species?. *Neotropical Ichthyology*, 3(2): 277-284, 2005.
- TORRES, R. Molecular taxonomy of *Plagioscion* Heckel (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná River, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23, 1235-1242. 2006.
- TRAPE, S.; DURAND, J-D.; GUILHAUMON, F.; VIGLIOLA, L.;

- PANFILI, J. Recruitment patterns of young-of-the-year mugilid fishes in a West African estuary impacted by climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 357–367. 2009.
- TREML E.; HALPIN P.; URBAN D.; PRATSON L. Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine conservation. *Landscape Ecology*, 23: 19-36. 2008.
- UNAJAK, S.; MEESAWAT, P.; ANYAMANEERATCH, K.; ANUWAREEPONG, D.; SRIKULNATH, K.; CHOOWONGKOMON, K. Identification of species (meat and blood samples) using nested-PCR analysis of mitochondrial DNA. *African Journal of Biotechnology* 10: 5670-5676. 2011.
- VALENTE, M. H. M.; ALVES, D. S.; MAIA, R. Caracterização oceanográfica da região Nordeste e Leste brasileira. *Revista Pesquisa Naval*, 18: 32-38. 2005.
- VASCONCELOS-FILHO, A.L. Estudo do conteúdo estomacal de *Mugil curema* Valenciennes, 1836 e *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Pisces- Mugilidae), cultivados em viveiro estuarino da Área de Itamaracá (Pernambuco-Brasil). *Trab. Ocean. Univ. Fed. PE.*, 21: 345-362. 1990.
- VIEIRA, J. P.; SCALABRINI, C. Migração reprodutiva da "Tainha" (*Mugil Platanus* Günther, 1980) no Sul do Brasil. *Atlântica* 13(1): 131-141. 1991.
- VIEIRA, J.P. Juvenile Mulletts (Pisces:Mugilidae) in the Estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 2: 409-418. 1991.
- WARD, R. D.; HOLMES, B. H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c

- oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7:899–907, 2007.
- WARD, R.; ZEMLAK, T.; INNES, B.; LAST, P.; HEBERT, P. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B* 360: 1847-1857. 2005. doi: 10.1098/rstb.2005.1716
- WASKO, A. P.; GALETTI JR, P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* 474: 131–137. 2002.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants. Boca Raton, USA. 322 p. 2004.
- WHITFIELD, A. K.; PANFILI, J.; DURAND, J.-D. A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus 1758 (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex *Rev Fish Biol Fisheries* 22(3): 641-681 doi: 10.1007/s11160-012-9263-9
- WILLIAMS, D. A.; BROWN, S. D.; CRAWFORD, D. L. Contemporary and historical influences on the genetic structure of the estuarine-dependent Gulf killifish *Fundulus grandis*. *Marine Ecology Progress Series* 373: 111-121. 2008. doi: 10.3354/meps07742
- WOLF, C.; RENTSCH, J.; HUEBNER, P. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *Journal of agricultural and food chemistry* 47: 1350-1355. 1999. doi: 10.1021/jf9808426
- WRIGHT, S. Evolution and Genetics of Populations. Vol. 4., University of Chicago Press, Chicago. 1978.

- YEH, F. C.; BOYLE, T. Y. Z.; XIYAN, J. M. (Eds.). POPGENE Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Alberta, Can: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D.; SHEETS, D. H.; FINK, W. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press, Elsevier, 443 p. 2004.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183. 1994.