

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Filogeografia das espécies de tainha, *Mugil liza* e *M. platanus*
(Teleostei: Mugiliformes)**

Zoila Raquel Siccha Ramirez

Botucatu

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Filogeografia das espécies de tainha, *Mugil liza* e *M. platanus*

(Teleostei: Mugiliformes)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADA: Zoila Raquel Siccha Ramirez

ORIENTADOR: Dr. Claudio de Oliveira

CO-ORIENTADOR: Dr. Naércio Aquino de Menezes

Botucatu

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação

Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Siccha Ramirez, Zoila Raquel.

Filogeografia das espécies de tainha, *Mugil liza* e *M. platanus* (Teleostei:
Mugiliformes) / Zoila Raquel Siccha Ramirez. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Botucatu 2011.

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Naércio Aquino de Menezes

Capes: 20204000

1. Tainha (Peixe) - Filogeografia.

Palavras-chave: Citocromo-oxidase-subunidade-I; DNA mitocondrial; Filogeografia;
Mugilideos; Peixe-marinho

Mi única herencia va a ser ...tu educación!!!

Mi mamá

Agradecimientos

Yo creo que si tuviera que agradecer a todas las personas que me ayudaron para estar donde estoy ahora y sobrevivir a pesar de todo tendría que hacer una nueva disertación. Es difícil para una persona que es extranjera tener que adaptarse a un país que no es el suyo, las diferencias culturales, la comida, los amigos es diferente muy chévere en muchos momentos por ser algo novedoso y de cierta forma atrayente, pero la necesidad de la casa, de la mamá son siempre perennes e insustituibles, extraño el abrazo de mi mamá, las conversaciones con mi papá, las peleas con mis hermanos y la bulla de Mafer, mi sobrina y claro como no extrañar a mis nenas “blanca y manchas” mis dos conejitas peruanas.

Uno no es consciente de las cosas que tiene hasta que las pierde...eso dice el dicho y ahora compruebo que es cierto, deje en el Perú muchos momentos que no volverán jamás, mi abuelito se fue y no me despedí por última vez de él, eso fue algo que me dolió mucho, sé que mi abuelo siempre se sintió orgulloso de mi ojala no lo haya defraudado.

Siempre me he sentido una persona con mucha suerte porque sé que Dios a quien agradezco todos los días pone en mi camino a las personas adecuadas, gracias a todas las personas que alguna vez se cruzaron en mi camino.

Agradezco a mis papás Zoila y Pablo por la paciencia, el apoyo y la confianza que durante toda mi vida tuvieron conmigo, ellos no sólo son mis papis sino también mis amigos, mis mejores consejeros, son mi motor de cada día, son mis brazos y mis piernas, yo creo que sólo Dios sabe cuánto yo le agradezco a mis papas por todo. Mis logros fueron por ellos y mis derrotas por algo que no escuche de ellos. Para mí, mis papas son los mejores del mundo!!!

Agradezco a mis hermanos Omar, Dalia, Pablito, Sole y Rosa por el apoyo, la fuerza, la preocupación, a pesar que podíamos pelear muchas veces por cosas tontas, ustedes no saben cuanta falta le hacen a mi vida. Y claro mis sobrinos, que son el sonido de la casa sin ustedes la casa estaría vacía inundada de gente vieja. Algo que me duele mucho es haber dejado a mi familia.

Agradezco a mis amigos de toda la vida y en especial a Isa, “mi ñaña”, no es una hermana de sangre pero es como si lo fuera, gracias por escucharme y soportarme sé que no soy una persona fácil. A mis amigos Imarpinos que todos los viernes se acordaban de mandar un email diciendo: Rachel nos estamos yendo a beber “pisco sour”, sin mí. Y a mi ex jefe que siempre me preguntaba ¿cómo iban las cosas por el Brasil? Al Dr. Llanos por la amistad, el cariño, la confianza y porque siempre me dice que cuando regrese a Perú, mi casa, me espera con los brazos abiertos.

Agradezco enormemente a Claudio de Oliveira, mi orientador, por la confianza que deposito en mí sin conocerme, por la fuerza, el apoyo, las enseñanzas, por brindarme su amistad, sin la ayuda de usted yo no tendría como estar ahora acá.

Al profesor Fausto Foresti, por la ayuda en cualquier momento, por ser un excelente profesor, una buena persona que siempre me inspira tranquilidad y confianza.

Agradezco a Mauro Nirchio por la enorme ayuda en la biología y genética de los mugilidos y por la amistad proporcionada.

Agradezco a Ricardo Britzke y a su linda familia, ustedes son 101% chéveres, gracias por el consuelo en mis momentos de depresión, por la fuerza, por tratarme con mucho cariño haciendo que algunas veces sintiera que formaba parte de un lindo ambiente familiar.

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Biología y Genética de peces que hicieron mis días entretenidos, a Kelly por la amistad y los buenos momentos de diversión y compañía. A Fabio “Fio” por la gran ayuda, la paciencia para enseñarme muchas cosas interesantes, por las conversaciones los días domingo en el laboratorio y sobre todo por todas las buenas ideas y sugerencias, prometo no “molestarte” mucho después. A Bruno Melo, por la ayuda en la corrección del portugués, por los buenos comentarios y su enorme ayuda. A Luz porque sé que no soy la única en el laboratorio que extraña volver a casa, por entender mejor que nadie como me podía sentir. A Débora, Patricia, Vivi, Gleysi y Andréia por ser unas excelentes amigas y porque siempre estaban dispuestas a ayudarme. A Zeca por sus comentarios y por la ayuda incondicional. Y a todos los demás amigos del Laboratorio por la compañía, amabilidad, por integrarme con ellos y compartir conmigo las parrilladas, gracias chicos. Y por supuesto a Doña Tera por tratarme como si fuera mi abuela.

Agradezco a Michel Abanto, una persona muy especial en mi vida, quien cultivo el cariño y la curiosidad por la biología molecular, por confiar en mí y motivarme para intentar ser una buena persona, buena hija, hermana, estudiante, etc., gracias por el tiempo de dedicación y por el cariño. Gracias a Samuel A., espero que mis decisiones y mis actos hayan valido la pena.

Agradezco al Brasil por ser un país receptivo, y al CNPq y a la FAPESP, instituciones que me financiaron estos dos últimos años.

No puedo terminar sin antes agradecer a Ysis, “a capete” gracias por hacer que mis noches sean trabajosas y hacerme saber que no estaba solita en casa.

Resumo

A família Mugilidae inclui dezessete gêneros e mais de 60 espécies e apresenta distribuição mundial, exceto nas regiões polares. O *status* taxonômico de algumas espécies e gêneros dentro desta família ainda é confuso, devido a sua alta homogeneidade morfológica. Sete espécies são encontradas no Brasil, sendo *M. liza* e *M. platanus* encontradas em maior abundância. *M. liza* está distribuída desde a Flórida até o Rio de Janeiro e *M. platanus* desde o Rio de Janeiro até a Argentina. Com o desenvolvimento desse trabalho, pretendeu-se testar a hipótese de que *M. liza* e *M. platanus* constituem uma única espécie e verificar se estas espécies são distintas de *M. cephalus*. Para tanto, empregamos as seqüências de seis genes mitocondriais: COI de 654 pb, 16S rRNA de 609pb, 12S rRNA de 423pb, ATPase 6 de 579pb, ATPase 8 de 117pb e Cytb de 975pb. Foram analisados 85 indivíduos de *M. liza*, *M. curema*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. incilis*, *M. rubrioculus*, *M. hospes* e *M. sp.* procedentes do Brasil, da Argentina, do Uruguai, da Venezuela e da Grécia (*M. cephalus*). Os resultados mostraram uma separação de todas as espécies, com um consistente índice de *bootstrap* (100%), os exemplares de *M. liza* e *M. platanus* formaram um só clado, com uma divergência genética de 0%, sugerindo que este clado constitui uma única espécie sem uma estruturação populacional evidente, indicando um alto grau de fluxo gênico mesmo com uma ampla distribuição no oceano Atlântico. *Mugil cephalus* e *M. liza* apresentaram uma distância genética interespecífica de 19,5%, sugerindo que são espécies diferentes, mesmo apresentando muitas semelhanças morfológicas. Nossos dados evidenciaram a presença de três linhagens diferentes dentro de *M. curema* formando assim um complexo de espécies que precisa ser resolvido. Concluimos que *M. liza* é uma única espécie semelhante morfológicamente a *M. cephalus* mas diferente geneticamente.

Abstract

The family Mugilidae includes seventeen genera and more than 60 species worldwide distributed, except in the polar regions. The taxonomic status of some species and genera within this family is still confused, due to its high morphological uniformity. Seven species are found in Brazil being *Mugil liza* and *M. platanus* the most common species. *M. liza* is distributed from Florida to Rio de Janeiro and *M. platanus* from Rio de Janeiro to Argentina. With the development of this work, we sought to test the hypothesis that *M. liza* and *M. platanus* constitute a single species and to verify if these species are distinct from *M. cephalus*. For this, we used the sequences of six mitochondrial genes: COI of 654pb, 16S rRNA of 609pb, 12S rRNA of ATPase 8 of 579pb, ATPase 6 of 117pb and Cytb of 975pb. We analyzed 85 individuals of *M. liza*, *M. curema*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. incilis*, *M. rubrioculus*, *M. hospes* and *M. sp.* from Brazil, Argentina, Uruguay, Venezuela and Greece (*M. cephalus*). The results showed a separation of all species, with a consistent bootstrap index (100%), specimens of *M. liza* and *M. platanus* formed one clade, with a divergence of 0%, suggesting that this clade represents a single species without a clear population structure, showing high degree of gene flow even with a wide distribution in the Atlantic Ocean. *Mugil cephalus* and *M. liza* showed interspecific genetic distance of 19,5% suggesting that they are different species, even with many morphological similarities. Our data revealed the presence of three different lineages within of *M. curema* thus forming a complex of species that must be resolved. We conclude that *M. liza* is a single species morphologically similar to *M. cephalus* but genetically different of it.

Resumen

La familia Mugilidae incluye diecisiete géneros y las de 60 especies y presenta distribución mundial, excepto en las regiones polares. El status taxonómico de algunas especies y géneros dentro de esta familia aun es confuso, debido a su alta homogeneidad morfológica. Siete especies son encontradas en el Brasil, siendo *M. liza* y *M. platanus* las encontradas en mayor abundancia. *M. liza* está distribuida desde Florida hasta Rio de Janeiro y *M. platanus* desde Rio de Janeiro hasta Argentina. Con el desarrollo de este trabajo, se pretende probar la hipótesis de que *M. liza* y *M. platanus* constituyen una única especie y verificar si estas especies son distintas de *M. cephalus*. Para lo cual empleamos las secuencias de seis genes mitocondriales: COI de 654 pb, 16S rRNA de 609pb, 12S rRNA de 423pb, ATPasa 6 de 579pb, ATPasa 8 de 117pb y Cytb de 975pb. Fueron analizados 85 individuos de *M. liza*, *M. curema*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. incilis*, *M. rubrioculus*, *M. hospes* y *M. sp.* Procedentes del Brasil, Argentina, Venezuela, Uruguay y de Grecia (*M. cephalus*). Los resultados mostraron una separación de todas las especies, con un consistente índice de *bootstrap* (100%), los ejemplares de *M. liza* y *M. platanus* formaron un solo clado, con una divergencia genética de 0% sugiriendo que este clado constituye una única especie sin estructuración poblacional evidente, indicando un alto grado de flujo génico a pesar de tener una amplia distribución en el océano Atlántico. *Mugil cephalus* y *M. liza* presentaron una distancia genética inter-específica de 19,5%, sugiriendo que son especies diferentes, a pesar de tener muchas semejanzas morfológicas. Nuestros datos evidenciaron la presencia de tres linajes diferentes dentro de *M. curema* formando así un complejo de especies que necesita ser resuelto. Concluimos que *M. liza* es una única especie semejante morfológicamente a *M. cephalus* pero diferente genéticamente.

Sumário

1.Introdução.	01
1.1 Aspectos gerais	01
1.2 Tainhas	02
1.3 O genero Mugil	04
1.3.1 Mugil no Brasil	05
1.4 Estudos citogenéticos.	07
1.5 Exploração Pesqueira	08
1.6 Exploração pesqueira no Brasil	09
1.7 Identificações de estoques e variabilidade populacional	13
1.8 Marcadores moleculares	15
1.9 Filogeografia baseada em análises de haplótipos de DNA	19
2. Objetivos	21
3. Material e Métodos	20
3.1 Coleta e localidade das amostras	21
3.2 Extração de DNA genômico	25
3.3 Amplificação dos genes	26
3.4 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose	31
3.5 Purificação das Amostras Amplificadas	32
3.6 Reação para PCR de Sequenciamento	32
3.7 Limpeza do PCR de Sequenciamento	33
3.8 Sequenciamento de DNA	34
3.9 Obtenção de sequências consenso	34
4.0 Alinhamento das sequências e Análise dos dados	34
4.0.1 Alinhamento das seqüências	34
4.0.2 Análises dos dados	35
4.0.3 Rede de haplótipos	38
4. Resultados	39
4.1 Gene 12S rRNA	39
4.2 Gene 16S rRNA	39

4.3 Gene ATP Sintetase 8	40
4.4 Gene ATP Sintetase 6	40
4.5 Gene Citocromo Oxidase subunidade I	40
4.6 Gene Citocromo B	41
4.7 Elaboração da Matriz dos genes	41
4.8 Rede de haplótipos	45
5. Discussão	47
6. Conclusões	53
7. Referencias	55
8. Anexos	78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Dois terços do nosso planeta é coberto por água e grande parte destes ambientes fornece suporte para a vida dos peixes, que correspondem à cerca de 50% dos vertebrados (Nelson, 2006).

Do ponto de vista evolutivo os peixes formam um grupo polifilético, com 27.977 espécies, o que representa mais da metade do número total de vertebrados conhecidos (Nelson, 2006). É importante destacar que a descrição de novas espécies pertencentes ao grupo dos anfíbios, répteis, aves e mamíferos não é muito frequente, mas muitas novas espécies de peixes são descritas continuamente o qual pode elevar seu número total a aproximadamente 32,500 (Nelson, 2006). Além do grande número de espécies, outro aspecto relevante é a importância que os peixes têm para as populações humanas. De fato, o tema referente aos peixes aparece em diversos aspectos da cultura humana incluindo a mitologia, a religião, a literatura e a arte e constituem a dieta principal de muitas comunidades, ocupando um papel importante na economia de muitas nações e representam uma significativa fonte de trabalho nas sociedades que dependem em grande medida da atividade pesqueira.

Os peixes são extraordinariamente diversos em suas características anatômicas e fisiológicas. Têm desenvolvido especializações espetaculares e inumeráveis para lograr funções biológicas básicas, tais como alimentação, movimento e reprodução. Os peixes apresentam uma considerável capacidade de adaptação biológica a diversos tipos de habitat, com grande variedade ambiental, espacial e temporal. Neste processo podemos observar as mais impressionantes especializações de morfologia, fisiologia e comportamento (Purdom, 1993). Com esta diversidade em estrutura e função, os peixes vivem em uma ampla gama de ambientes aquáticos. Podem ser encontrados suportando

temperaturas que vão desde 44°C, como algumas tilápias da África, a -2°C na Antártica. Habitam lagoas, rios, estuários e oceanos de todo o mundo. A maioria vive inteiramente na água doce ou em mares e oceanos e outros efetuam grandes movimentos migratórios (Nelson, 2006).

1.2 Tainhas

Os mugilídeos são comumente conhecidos no Brasil como “tainhas”, “parati”, “curimã”, “caíca” (Menezes, 1983; Menezes e Figueiredo, 1985), sendo peixes pelágicos catádromos (passam parte de sua vida em água doce e depois voltam ao oceano) (McDowall, 2007) que habitam regiões costeiras, estuários (Harrison e Howes 1991) e muitas vezes entram também nos rios, sendo amplamente distribuídos por todo o mundo em águas tropicais e subtropicais (Cervigón, 1993; Cervigón *et al.*, 1993) exceto em ambientes polares. Muitas espécies nadam rio acima, sendo que umas poucas passam toda a vida adulta no rio (Smith e Smith, 1986; Cardona, 2006). Os grandes cardumes de mugilídeos migram de seus ambientes de alimentação nos rios, estuários, lagos e lagoas até o mar para desovar e têm um ciclo de desova por cada estação. Os períodos de desova se diferenciam segundo a espécie e regiões (Maitland e Campbell, 1992; Saleh, 2006). São espécies de muita importância comercial e são altamente exploradas ao longo de toda sua distribuição (Cervigón, 1993; Cervigón *et al.*, 1993).

Os mugilídeos são animais detritívoros, alimentando-se do lodo orgânico que cobre o fundo marinho, frequentemente saltam fora da água, por motivos inexplicáveis; um estudo mostrou que a frequência de saltos aumenta quando os níveis de oxigênio dissolvido são baixos (Hoese, 1985).

A maior parte destas espécies geralmente alcançam cerca de 20 cm de comprimento, mas alguns podem chegar entre 80 – 120 cm. A cabeça é ampla e

achatada dorsalmente na maioria das espécies. O focinho é curto e a boca é pequena. Os arcos branquiais de muitas espécies são especializados, formando a característica do órgão faringeobranqueal que é dilatado, o qual é empregado para a filtração do material ingerido. Em muitas espécies de mugilídeos, os dentes são diminutos e estão colocados sobre os lábios. Os olhos podem ser parcialmente cobertos por um tecido adiposo. Têm duas nadadeiras dorsais bem separadas, a primeira com raios duros e a segunda com oito a dez raios ramificados. A nadadeira anal é curta; com dois ou três raios duros e sete a doze raios segmentados não ramificados em adultos. As nadadeiras peitorais são grandes sobre o corpo, e a nadadeira caudal é sutilmente bifurcada. Não apresenta linha lateral. As escamas são moderadas em tamanho, com um ou mais sulcos longitudinais. Têm os cecos pilóricos associados ao estômago, e uma moela grossa, muscular na maior parte das espécies. Os mugilídeos são dorsalmente acinzentados, verdes ou azuis, e sua superfície lateral é prateada, e apresentam frequentemente raias longitudinais escuras. Eles são ventralmente pálidos ou amarelados (Nelson, 1994; Harrison, 1999).

A identificação das espécies de mugilídeos é problemática, especialmente em estágios larvais e de alevinos (Imsiridou *et al.*, 2007) devido à sua alta conservação da morfologia externa (Caldara *et al.*, 1996; Papatropoulos *et al.*, 2001), a falta de caracteres taxonômicos úteis (Menezes, 1983; Menezes e Figueiredo, 1985; Cervigón, 1993; Thomson, 1997) e a homogênea estrutura cariotípica. Além disso as características morfológicas e morfométricas são comumente empregadas para distinguir espécies. Outras características usadas para o diagnóstico são o esqueleto e a anatomia muscular (Harrison e Howes, 1991), eletroforeses com enzimas ou proteínas (Herzberg e Pasteur, 1975; Menezes *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1998), e análises de sequências de DNA mitocondrial (Caldara *et al.*, 1996).

1.3 O gênero *Mugil*

Mugilidae é a única família da ordem Mugiliformes, série Mugilomorpha, a mais primitiva entre as três séries da superordem Acanthopterygii (Nelson, 2006). Devido à considerável uniformidade dos caracteres morfológicos externos, esta família tem sido objeto de numerosas revisões, a nível de espécie e de gênero. A primeira revisão detalhada é a de Schultz (1946) que identificou 16 gêneros e, subsequentemente, revisou o gênero *Chelon* (Schultz, 1953). Nos anos seguintes, além de algumas revisões sistemáticas localmente restritas (citadas em Thomson, 1997), a organização taxonômica da família foi repetidamente definida por Thomson (1954, 1963, 1997). Em seu último e mais abrangente trabalho, Thomson (1997) identifica 280 espécies nominais e reconhece como válidos 14 gêneros: *Agonostomus*, *Aldrichetta*, *Cestraeus*, *Chaenomugil*, *Chelon*, *Crenimugil*, *Joturus*, *Liza*, *Mugil*, *Myxus*, *Oedalechilus*, *Rhinomugil*, *Sicamugil* e *Valamugil* e 62 espécies, deixando 18 espécies com o status de *espécies inquerenda*. Nelson (2006) reconhece 17 gêneros (incluindo *Moolgarda*, *Neomyxus* e *Xenomugil*) e cerca de 72 espécies. Uma consulta recente ao FishBase (Froese e Pauly, 2004; www.fishbase.org acessado em 06/11/2010) lista 18 gêneros e um total de 80 espécies. Em todos os trabalhos de revisão aproximadamente metade das espécies pertencem aos gêneros *Mugil* e *Liza*, que possuem 17 e 25 espécies respectivamente, enquanto muitos dos demais gêneros incluem somente uma ou duas espécies. Pesquisas em desenvolvimento (Ian Harrison, comunicação pessoal) indicam que a taxonomia do grupo ainda deve sofrer várias alterações nos próximos anos.

1.3.1 *Mugil* no Brasil

O número de espécies de mugilídeos descritos na costa norte e sul da América, incluindo toda a costa inteira do Brasil, varia entre sete e oito (Cervigón *et al.*, 1993;

Thomson, 1997; Menezes *et al.*, 2003). *Mugil* é o único gênero que ocorre na costa do Brasil, incluindo as espécies: *M. curema*, *M. curvidens*, *M. liza*, *M. platanus*, *M. gaimardianus*, *M. incilis* e *M. trichodon* (Menezes, 1985). O nome *M. gaimardianus* foi suprimido (ICZN, 1994) e a espécie passou a ser identificada como *Mugil* sp. (Menezes *et al.*, 2003). Em 2007 uma nova espécie, *Mugil rubrioculus*, foi descrita para a região oriental da América Central (Harrison *et al.*, 2007). Essa espécie também ocorre no litoral brasileiro, onde era identificada como *M. gaimardianus*.

Entre as espécies que atingem maior tamanho estão *Mugil liza* e *M. platanus* (Menezes e Figueiredo, 1985). *M. liza* foi descrita por Valenciennes, 1836 da região da Martinica, no Caribe e *M. platanus* foi descrita por Gunther, 1880 de Buenos Aires, Argentina. Essas duas espécies compartilham o padrão de colorido, caracterizado pela presença de estrias escuras longitudinais alternadas com estrias claras, e a ausência quase total de escamas nas nadadeiras anal e segunda dorsal (Menezes, 1983). As características usualmente empregadas para separar essas duas espécies são o menor número de séries laterais de escamas em *M. liza* (29 a 34) com relação a *M. platanus* (34 a 40, mais comumente 36 ou 37) e a ocorrência em áreas geográficas distintas, pois *M. liza* está distribuída do Caribe até o Rio de Janeiro e *M. platanus* está distribuída do Rio de Janeiro até a Argentina (Menezes, 1983). Cousseau (2005) sugere que a espécie encontrada no Sul do Brasil e na Argentina é *M. platanus* a qual é reconhecida como diferente de *M. liza*. Esta conclusão foi confirmada por Castro *et al.* (2008) que adicionalmente indica que *M. platanus* difere de *M. cephalus*, baseado em dados de DNA mitocondrial, morfométricos e merísticos. Heras *et al.* (2009) sugere que *M. platanus* e *M. liza* “representam uma espécie contínua muito relacionadas entre si, mas diferente de *M. cephalus*”. Menezes *et al.* (2010) em um estudo com maior quantidade de exemplares mostram a ocorrência de um padrão de variação latitudinal

provavelmente associado com uma diminuição da temperatura da água costeira de Norte a Sul do Atlântico Ocidental o qual se evidencia em grandes diferenças morfológicas. Mas os autores chegam à conclusão que existe apenas uma única espécie na região. O nome válido disponível para essa espécie é *Mugil liza*, Valenciennes 1836, sendo *Mugil platanus*, Gunther, 1880; considerado sinônimo júnior.

A co-ocorrência de uma segunda espécie de *Mugil*, semelhante a *M. liza*, tem levantado algumas questões. Se *M. cephalus* é distribuída a partir da Índia Ocidental até a Argentina (Harrison, 2003), seria simpátrica com *M. liza*, embora alguns pesquisadores discordem (Ringuelet e Aramburu, 1960; Ringuelet *et al.*, 1967; Menezes, 1983; Menni *et al.*, 1984, 1995; Almirón *et al.*, 1992; López *et al.*, 2003). Por exemplo, se ambas espécies apresentam a mesma distribuição nas águas costeiras do nordeste do Brasil, as mesmas deveriam ser coletadas juntas, mas a presença de *M. liza* (Menezes, 1983 e 2003; Menezes e Figueiredo, 1985) junto com *M. cephalus* (Rivas, 1980; McEachran e Fechhelm, 1998; Greenfield e Thomerson 1997; Castro Aguirre *et al.*, 1999; Smith-Vaniz *et al.*, 1999), ainda é questionável (Menezes *et al.*, 2010).

Segundo Menezes *et al.* (2010) a questão da identificação das espécies de *Mugil* na costa atlântica da América do Sul nunca foi tratada adequadamente, seja pela pouca quantidade de exemplares que se encontravam disponíveis (Menezes, 1983; Menezes e Figueiredo, 1985, Thomson, 1997; Harrison, 2003) ou porque apenas uma parte da área de distribuição de ocorrência foi considerada (Vazzoler *et al.*, 1990; Cousseau *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2008; Heras *et al.*, 2009).

Dados merísticos referentes ao número de escamas revelou uma diferença significativa ($p < 0,001$) no número de escamas transversais, as linhas de escamas

horizontais e circumpedunculares sugerem que *Mugil liza* e *M. cephalus* são espécies diferentes (Menezes *et al.*, 2010).

1.4 Estudos citogenéticos

A maioria das espécies da família Mugilidae apresenta um número diplóide de 48 cromossomos (Cataudella *et al.*, 1974; Delgado *et al.*, 1992; Jordão *et al.*, 1992; Crosetti *et al.*, 1993; Rossi *et al.*, 1996, 1997; Nirchio *et al.*, 2001, 2003) exceto *M. curema* que tem um número diplóide de 24 a 28 (LeGrande e Fitzsimons, 1976; Nirchio *et al.*, 2003, 2005), e *M. incilis* que apresenta $2n = 28$ (Galetti *et al.*, 2000).

Os últimos estudos citogenéticos na família Mugilidae foram revisados por Sola *et al.* (2007). Neste estudo foram analisados os dados referentes a 16 espécies cujos cariótipos foram divididos em três grupos. O Citótipo A que corresponde a um cariótipo composto de 48 cromossomos acrocêntricos, caracterizando 10 espécies: duas espécies de *Liza* (*L. macrolepis* e *L. oligolepis*), cinco de *Mugil* (*M. cephalus*, *M. gaimardianus*, *M. liza*, *M. platanus* e *M. trichodon*) e as espécies *Rhinomugil corsula*, *Liza parsia*, *Valamugil speigleri*. O Citótipo B que corresponde a um cariótipo composto de 46 cromossomos acrocêntricos mais dois cromossomos submetá/subtelocêntricos, caracteriza cinco espécies: *Liza aurata*, *L. ramada*, *L. saliens*, *Chelon labrosus* e *Oedalechilus labeo*. O Citótipo C que corresponde a um cariótipo principalmente, ou exclusivamente, composto de cromossomos de dois braços, caracteriza somente uma espécie, *Mugil curema*. Nos exemplares da Louisiana (USA) e do Paraná (Brasil), foram observados cariótipos compostos de $2n=28$ cromossomos, 20 metacêntricos, 4 subtelocêntricos e 4 acrocêntricos. Em espécimes do Mar do Caribe, Venezuela, foram encontrados exemplares com $2n=24$ cromossomos, todos com dois braços. Recentemente foi descrito o cariótipo de *Agonostomus monticola*, uma espécie do

gênero considerado mais primitivo da família Mugilidae, que apresentou $2n=48$ cromossomos e cariótipo composto de 46 cromossomos acrocêntricos e dois cromossomos subtelocêntricos (Nirchio *et al.*, 2009).

Em *Mugil curema*, os últimos estudos revelaram a existência de três subgrupos interligados, baseados nas diferenças cariotípicas e aloenzimáticas. Os cromossomos de *M. curema* do Brasil ($2n = 28$ representando o citótipo 1, Nirchio *et al.*, 2005) são considerados também para a verdadeira *M. curema* reportada por LeGrande e Fitzmons (1976) em um estudo no Golfo de México. O segundo cariótipo ($2n=24$, citótipo 2) foi encontrado na Venezuela (Nirchio e Cequea, 1998; Nirchio *et al.*, 2003). Um terceiro cariótipo ($2n=48$; citótipo 3) também foi encontrado na Venezuela e na costa do Pacífico no Panamá (Nirchio *et al.*, 2003, 2007) e isto foi descrito como *M. rubrioculus* por Harrison *et al.* (2007), quem fez um diagnóstico morfológico e forneceu uma descrição dessa nova espécie. Assim, três diferentes espécies geneticamente ou tipos de *M. curema* podem coexistir em águas da América (Heras *et al.*, 2009)

1.5 Exploração Pesqueira

Os mugilídeos são peixes de importância comercial (FAO, 2005) onde os indivíduos são comercializados no Mercado como peixes frescos, secos, salgados e congelados. Além disso, os ovos são vendidos frescos, defumados e secos, representando um importante recurso econômico em alguns países do mediterrâneo. Também são usados na medicina chinesa e são amplamente cultivados em lagoas de água doce no sudeste da Ásia (FAO, 2005).

Os animais são comumente capturados com tarrafas ou galeria de redes artesanais dos pescadores no mar, lagos e lagoas costeiras. Baseado na estatística

publicada pela FAO (2004) são capturados mundialmente 261.000 toneladas aproximadamente que representa 0,3% da pesca mundial (FAO, 2004).

Os mugilídeos são cultivados em todo o mundo, usualmente em sistemas de cultivos extensivos e semi-intensivos (Saleh M., 2008).

1.6 Exploração pesqueira no Brasil

Mugil curema chamada de parati é considerada a espécie de Mugilidae mais comum do litoral brasileiro, atingindo no máximo 45 cm de comprimento, sendo mais comuns exemplares em torno de 30 cm.

As tainhas, em particular, são recursos pesqueiros importantes no Brasil (Reis e D'Incao, 2000). Ultimamente um menor número de barcos direciona suas pescarias para a tainha, porém com uma maior eficiência na captura deste recurso, este fato é comprovado pelo menor número de viagens realizadas com captura de tainha e o simultâneo aumento da captura por unidade de esforço (CPUE) a partir de 2000. Nos últimos anos, com o declínio das capturas da sardinha-verdadeira, a tainha passou, mesmo que para apenas uma parcela da frota, a ser uma espécie alternativa com importância comercial, principalmente durante os meses de inverno (Gasalla *et al.*, 2003). Nos últimos anos esta espécie encontra-se posicionada entre as 20 principais categorias de pescado desembarcadas (Miranda *et al.*, 2007).

O setor artesanal utiliza, tradicionalmente, o recurso tanto em alimentação (subsistência e comercialização), quanto em suas manifestações culturais, que movimentam um importante mercado turístico-gastronômico ao longo de todo o litoral sudeste e sul brasileiro. Já, o setor industrial (comercial de médio e grande porte) encontrou na tainha, principalmente após o ano 2000, um potencial recurso alternativo, bastante valorizado pelo mercado consumidor, em substituição aos recursos tradicionais

que vêm mostrando declínios importantes tanto em captura quanto em rendimento (Miranda *et al.*, 2007). O desenvolvimento tecnológico e o aumento do poder de pesca causado pelo uso de ecosonda, sonar, GPS e “Power Block” que possibilitou o aumento do tamanho das redes de cerco, atingindo até 1.400 m de comprimento e mais de 100 m de altura, com malha de 12mm medidas de nó a nó, tornaram a tainha altamente vulnerável, resultando na diminuição da captura dessa espécie por pescadores artesanais (Seckendorff e Azevedo, 2007).

A Lagoa dos Patos, na costa sul brasileira, estado de Rio Grande do Sul, e áreas adjacentes costeiras suportam uma das mais importantes pescarias no sudeste Atlântico, com aproximadamente 3.500 pescadores artesanais e 3.000 pescadores industriais envolvidos na atividade pesqueira nesta região (Haimovici *et al.*, 1996; Reis e D'Incao, 2000). O estuário é uns dos mais importantes lugares de desova das espécies mais importantes na indústria pesqueira no Brasil. A tainha, *Mugil liza* (antigamente chamada de *M. platanus*) é uma das espécies de peixes mais abundante nesta área e são frequentemente capturadas, representando um objetivo tradicional para a pesca artesanal (Chao *et al.*, 1985; Vieira e Castello, 1996).

A importância pesqueira de *M. liza* na região sul do Brasil e o predomínio de juvenis nas águas baixas do estuário da Lagoa dos Patos sugerem que este ecossistema funciona como importante lugar de desova (Vieira, 1991; Vieira e Scalabrin, 1991).

Na região sudeste do Brasil a tainha *Mugil liza* (anteriormente chamada de *M. platanus* Gunther, 1880) é a espécie que sustenta importantes pescarias com um alto valor comercial, podendo atingir cerca de 1 m de comprimento e cerca de 6 kg (Menezes *et al.*, 1985). A pesca da tainha é uma atividade tradicional do litoral sul de São Paulo, exclusivamente artesanal, podendo ocorrer junto à praia ou dentro do estuário. Em geral, durante o período de março a maio (antes da entrada das frentes

frias) a arte predominante nas capturas é o arrasto de praia principalmente no município de Ilha Comprida, e de maio a outubro predominam os cerco fixo e a rede de emalhe (de superfície e fundo) estuarino em Cananéia (Miranda *et al.*, 2007). No estado de São Paulo os desembarques são muito variáveis entre um ano e outro (Carneiro *et al.*, 2000; Ávila da- Silva e Carneiro, 2003a; Ávila da Silva e Carneiro, 2003b; Ávila da Silva *et al.*, 2004a; Ávila da Silva *et al.*, 2004b; Ávila da Silva *et al.*, 2005;), sendo extremamente dependentes das condições ambientais (Miranda *et al.*, 2006).

O total desembarcado desta espécie no litoral de São Paulo apresentou um pico de 504 toneladas em 1991, oscilando entre 129 e 353 toneladas entre 1992 e 2002, aumentou para 613 toneladas em 2004, diminuindo para 337 toneladas no ano seguinte. Considerando apenas o período entre 2001-2005, constatou-se que 50,2% da captura desembarcada tem sua origem na pesca artesanal, basicamente nos municípios de Iguape e Cananéia no litoral sul do estado, caracterizando uma grande importância do recurso para esta parcela do setor pesqueiro (Miranda *et al.*, 2007).

Praticamente a totalidade dos desembarques de tainha na Baixada Santista (estado de São Paulo) é realizada pela frota industrial de traineiras que opera com rede de cerco nos municípios de Santos e Guarujá. O número total de traineiras que desembarcaram nestes municípios entre 1990 e 2005 e o número de barcos que desembarcaram mais de duas toneladas de tainha. Em 2005, 26% dos barcos operantes desembarcam duas toneladas ou mais do recurso. A produção registrou um pico de 501 toneladas em 1991 e um subsequente comportamento oscilatório em declínio nos anos posteriores, atingindo em 2005, uma diminuição na ordem de 80% do verificado no início da série temporal considerada (Miranda *et al.*, 2007).

A produção de tainha vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, considerando as informações estatísticas para o ano 2004 (Ávilada-Silva, 2005), as

principais capturas desembarcadas de tainha ocorrem nos portos de Santos e Guarujá (53,4%) seguidos de Cananéia (25,6%) e Iguape (17,5%). Do total, 55,8% foi proveniente da frota industrial de traineiras, 20,5 % da pesca artesanal de cerco fixo e de 10,2 % da pesca com rede de emalhe. Do total de 613,6 toneladas desembarcadas, apenas 6,5% foi capturada com o arrasto de mão (ou arrasto de praia), arte de pesca tradicional para o recurso, no município de Iguape. No período 1995 a 1999 segundo Gasalla *et al.* (2003), a tainha aparece como quarta colocada dos desembarques de traineiras efetuados nos portos de Santos e Guarujá.

No 1998, a região do litoral sul de São Paulo entre os municípios de Santos, Guarujá e Cananéia desembarcaram juntos 115 t, com um pico de 269 t em 2004 e 240 t em 2005, sendo os municípios de Cananéia e Iguape os principais responsáveis por estes desembarques. Até 2003, Iguape desembarcou em média 50% das capturas de tainha, Cananéia 42% e Ilha Comprida 8%. Nos anos de 2004 e 2005, 56% da produção de tainha foi desembarcada em Cananéia, 42% em Iguape e somente 2% em Ilha Comprida (Miranda *et al.*, 2007).

A produção extrativa da tainha é mais elevada durante os meses de inverno e o preço elevado alcançado, principalmente de tainhas com ovos, posiciona o recurso como a principal safra da pesca artesanal na região. A maior parte da pesca desta espécie ocorre durante o período de migração reprodutiva desde a costa do Rio Grande do Sul até o litoral paulista. A presença de fêmeas maduras de tainha nos desembarques da região mostra que a pesca atua durante o período de reprodução da espécie, o que pode acarretar uma diminuição da abundância desta espécie e prejuízos para as pescarias dos próximos anos (Miranda *et al.*, 2007).

1.7 Identificações de estoques e variabilidade populacional

Principalmente para o setor pesqueiro, a identificação e manutenção de estoques diferenciados são fundamentais pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho e Hauser, 1994), sendo um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo, a conservação da variabilidade genética (Lacy e Lindenmayer, 1995). Essa questão é especificamente relevante no ambiente marinho, onde as barreiras físicas parecem ser menos efetivas (Awise, 1994; Palumbi, 1994), sugerindo uma tendência à homogeneização genética (Ward *et al.*, 1995; Levy e Cassano, 1994; Bonhomme *et al.*, 2002). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes, pode estimular a sobre-exploração, reduzindo ainda mais os níveis de variabilidade, diminuindo a produção comercial total e eliminando estoques locais (Smith *et al.*, 1990; Kuusipalo, 1999).

Segundo Haig (1998), os métodos de conservação devem ser adotados com base na estrutura das populações. Se uma população é estruturada, sua diversidade deve ser localmente conservada visto que já devem existir adaptações locais que seriam perdidas se esta população fosse misturada com indivíduos de outras populações. No entanto, se a população é homogênea em todos os pontos de sua distribuição, então pode-se optar por concentrar os esforços de proteção desta espécie em uma determinada área e utilizar estes espécimes como fonte de indivíduos para re-colonização de outras áreas mais impactadas, quando houver necessidade.

A variabilidade e diferenciação populacional podem ser o resultado de vários fatores, tais como seleção natural favorecendo genótipos ou alelos diferentes em cada subpopulação; processos aleatórios na transmissão dos alelos a cada geração (deriva

genética); diferenças ao acaso nas frequências alélicas dos fundadores das subpopulações e fluxo gênico entre as subpopulações.

O fluxo gênico exerce influência importante na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto cada população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1993). O grau e a direção do fluxo gênico entre populações separadas podem agir como uma poderosa força atuando na manutenção ou na homogeneização das diferenças genéticas (Slatkin, 1987). Desse modo, na presença de fluxo gênico intenso, as populações tendem a evoluir conjuntamente, uma vez que a migração atua na homogeneização das frequências alélicas. Por outro lado, quando o fluxo gênico é restrito ou ausente, cada população tende a evoluir de maneira independente. Embora o fluxo gênico tenda a ser uma força homogenizadora, ele também tem o potencial de levar à divergência entre subpopulações, através da criação e dispersão de combinações únicas de alelos (Slatkin, 1987), atuando como uma força criadora.

Segundo Avise (1994), pode ser determinado o grau de fluxo gênico e a estrutura genética de populações, a mobilidade do organismo e existência de barreiras físicas ou ecológicas, características comportamentais como filopatria, história de vida do organismo, padrões de dispersão e fluxo gênico ligados ao sexo, influencia diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais, eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética e a distância geográfica entre as populações.

No contexto da exploração pesqueira é frequente que populações de espécies com características muito próximas, incluindo a biologia e a forma, sejam exploradas em conjunto, e ocupem a mesma área geográfica durante a maior parte de seus ciclos vitais. Embora apresentem grandes semelhanças, cada uma apresenta tolerâncias

distintas aos fatores do meio ambiente, com propriedades essenciais entre os membros de cada táxon. Para evidenciar diferenças entre os táxons (espécies, populações) é necessário primeiramente determinar o seu status específico. A falta de distinção entre os táxons leva à avaliações errôneas de biomassa exploráveis, gerando risco de sobre-exploração (Camhi *et al.*, 1998).

A identificação das espécies que compõe um recurso pesqueiro é imperativa não somente pela importância científica que por si só representa, mas também do ponto de vista da gestão do recurso, já que as espécies possuem características biológicas diferentes como, fecundidade, taxa de crescimento, tamanho de maturidade e outras características populacionais importantes (Lessa, 1986). Resultados errôneos podem ser produzidos, se considerarmos diversas populações isoladas ou espécies distintas como uma única população.

1.8 Marcadores moleculares

Os padrões de DNA vêm sendo potencialmente reconhecidos como importantes em estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris e Berg, 1987; Toledo Filho *et al.*, 1992), fornecendo instrumentos de investigação que tornam possível distinguir populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos (Bermingham e Martin, 1998; Kotlik e Berrebi, 2002; Patarnello *et al.*, 2003; Falk *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Strecker *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Kartavtsev *et al.*, 2006) na identificação de espécies (Machida e Tsuda, 2010), análises de estoques estruturados e misturados e identificação de híbridos (Thangaraj e Lipton, 2010). E em outros organismos também é crescente o número de trabalhos (Souza *et al.*, 2003; Ludt *et al.*, 2004; Jesus *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Leaché e Mulcahy, 2007; Schultz *et al.*,

2008). Com base na distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial e no grau de divergência de sequências entre eles, Avise (2000) propõe e discute os organismos em relação a categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas.

Estudos populacionais recentes com animais marinhos têm utilizado os padrões de diferenciação genética também na determinação de regiões de berçários e na caracterização de filopatria em diversas espécies (Palumbi e Baker, 1994; Pardini *et al.*, 2001; Feldheim *et al.*, 2002; Schrey e Heist, 2003).

Dentre as metodologias moleculares disponíveis (RAPD, RFLP, AFLP e microssatélites), a que melhor identifica as variações geográficas entre populações é o sequenciamento de DNA (Hillis *et al.*, 1996). Os fatos que justificam esta afirmação decorrem de que os nucleotídeos são a unidade básica de informação codificada nos organismos; de que é relativamente fácil extrair e incorporar informações sobre processos de evolução molecular nas análises e de que o potencial de informações de dados fornecidos são imensos.

No conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stepien (1997), pode-se observar o versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos, variando desde populações até o grupo dos peixes como um todo. Entre os marcadores mais comumente utilizados em estudos populacionais estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Apresenta-se altamente conservado nos animais, variando de 14

a 26 kb (Billington e Hebert, 1991), sendo representado por 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) (Brown, 1999) e 13 genes que codificam proteínas, fazendo parte da cadeia respiratória, envolvidas na fosforilação oxidativa, no transporte de elétrons e na síntese de ATP (ATPase) (Lewin, 2004). A molécula de mtDNA possui uma região controle, de cerca de 1kb, que é rica em sequências AT e desprovida de genes, embora exerça importante papel no início da replicação do mtDNA e da transcrição do RNA. Esta região controle é conhecida como “D-loop” (*displacement loop*).

O gene citocromo oxidase C subunidade I codifica uma proteína relacionada à cadeia de transporte de elétrons. Este gene tem sido sucessivamente empregado para a identificação de espécies evidenciando significativas implicações taxonômicas (Consortium for the Barcode of Life, 2006) em peixes (Ward, *et al.*, 2005), libélulas (Ball *et al.*, 2005), etc.

O gene citocromo b codifica uma proteína relacionada à cadeia de transporte de elétrons. A química e ação dessa proteína ainda não são bem conhecidas (Palumbi *et al.*, 1996). Irwin *et al.*, (1990) examinaram, a evolução do citocromo b em mamíferos e Martin e Palumbi, (1993) compararam esses resultados da evolução dessas proteínas em tubarões. Ambos os estudos observaram que o nível de conservação variou significativamente em diferentes partes do gene citocromo b. A região final 3' do sentido da fita é mais variável, enquanto a parte codificante do gene é altamente conservado.

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do mtDNA assim como o 12S rRNA (Palumbi *et al.*, 1996). As sequências desse gene são razoavelmente

conservadas e evolui mais devagar do que o genoma mitocondrial como um todo (Palumbi *et al.*, 1996). Ainda segundo esse autor, existe uma considerável variação em algumas espécies, podendo ser usado para estudos em nível de população.

O gene ATPase subunidades 6 e 8 foram selecionados por ter uma região codificante que poderia ser facilmente alinhado a outras taxas e por apresentar uma baixa taxa de substituição do que a região controle, baseado geralmente em conhecimentos de mtDNA de peixes (Meyer, 1993) e dados comparados para alguns salmonídeos (Churikov *et al.*, 2001) e peixes do gênero *Thymallus* (Froufe *et al.*, 2005).

O interesse no estudo do mtDNA está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança exclusivamente materna e sua presença nos organismos em número haplóide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação. Além disso, possui um genoma compacto com estrutura e organização simples, ausência de introns, pseudogenes e elementos transponíveis e alta taxa de evolução (Lewin, 1994). Em razão disto, o mtDNA fornece informações relacionadas a estrutura populacional, sendo capaz de distinguir populações geográficas com grande eficiência através da identificação dos haplótipos ou clones de mtDNA. Entre suas possíveis aplicações incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética intra e interespecífica (Avise, 1986; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Beckenbach *et al.*, 1990); análise de zonas de contato (Ferris *et al.*, 1983; Szymura *et al.*, 1986) e de fluxo gênico (Brown e Chapman, 1991; Ong *et al.*, 1996; Sanetra e Crozier, 2003); estudo de biogeografia histórica (Bermingham e Avise, 1986; Sivasundar *et al.*, 2001; Beheregaray *et al.*, 2002), e caracterização de estrutura populacional (Graves, 1998; Stepien e Faber, 1998; Pestano e Brown, 1999), além do seu emprego crescente no campo da sistemática molecular, para inferências de relações

filogenéticas (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Alves-Gomes, 1998; Ortí *et al.*, 1996; Saitoh *et al.*, 2003; Thacker, 2003) e em estudos de conservação (Beheregaray *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

Em peixes, são vários os exemplos da utilização de haplótipos de mtDNA na resolução de problemas populacionais (Bermingham e Martin, 1998; Falk *et al.*, 2003; Patarnello *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Cortey *et al.*, 2004; Perdices *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Dodson *et al.*, 2007; Zemplak *et al.*, 2008; Mendonça *et al.*, 2009; Cardoso e Montoya-Burgos, 2009). E em outros organismos também é crescente o número de trabalhos (Souza *et al.*, 2003; Ludt *et al.*, 2004; Jesus *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Leaché e Mulcahy, 2007; Schultz *et al.*, 2008).

Além de tudo isso o genoma mitocondrial é muito mais eficiente do que os marcadores nucleares devido à diferencia do tamanho efetivo populacional nestes dois genomas (Machida e Tsuda, 2010).

1.9 Filogeografia baseada em análises de haplótipos de DNA mitocondrial

As observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies apresentam localização geográfica específica, introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “Filogeografia” (Avice *et al.*, 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de sequências entre eles, Avice (2000) propôs e discutiu cinco categorias filogeográficas, considerando aspectos da divergência de sequências entre populações alopátricas e simpátricas.

Na categoria I, estão incluídos os casos em que são observadas linhagens de mtDNA bastante divergentes, em geral valores superiores a 1-2%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria II, estão as linhagens de mtDNA divergentes que ocorrem na mesma área geográfica (Simpatria). Na categoria III, ocorrem linhagens de mtDNA com baixos valores de divergência de sequências, em geral menores que 1%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria IV, estão as linhagens de mtDNA com divergência de sequências muito baixas ou praticamente nulas e que estão geograficamente localizadas (Simpatria, com grande área de distribuição). Na categoria V, são encontradas linhagens pouco divergentes exibindo uma separação espacial parcial, sendo intermediária entre as categorias III e IV. De maneira geral, a presença de clones de mtDNA filogeneticamente próximos, reflete a ocorrência de fluxo gênico (ao menos, via materna), ou a presença de barreiras recentes, enquanto descontinuidades genéticas mais profundas, podem evidenciar separações populacionais historicamente mais antigas (Avise, 2000).

Ainda de acordo com Avise (2000), cerca de 56% (27) das espécies de peixes de água doce analisadas até aquele momento apresentaram padrão filogeográfico de estruturação populacional da Categoria I, enquanto 17 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria III a V e apenas 4 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria II. As 48 espécies listadas por Avise (2000) estão distribuídas em sistemas hidrográficos de vários continentes, principalmente Europa e América do Norte, chamando atenção o fato de que nenhuma espécie de peixe de água doce da região Neotropical (América do Sul e América Central) havia sido analisada filogeograficamente. Também em relação aos peixes marinhos, muito poucos estudos têm sido desenvolvidos com espécies do Brasil ou da América Central (McCafferty *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Como apontado acima, hoje, uma das principais questões relativas aos peixes do gênero *Mugil* diz respeito à identidade de *M. liza*, *M. platanus* e *M. cephalus* (Menezes et al., 2010). Assim sendo, com o desenvolvimento desse trabalho, pretende-se testar a hipótese de que *M. liza* e *M. platanus* constituem uma única espécie e se estas espécies são distintas de *M. cephalus*.

Para testar a hipótese apresentada foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar genótipos mitocondriais de amostras de *Mugil* da costa Atlântica da América Central e do Sul, com o objetivo de estimar seu grau de divergência genética.
- Verificar a possível existência de relação entre distribuição geográfica dos polimorfismos de sequências de DNA e os processos geográficos naturais que podem ter influenciado a presente distribuição dessas espécies.
- Propor uma hipótese filogeográfica para as amostras analisadas de *M. liza*, através da elaboração de uma rede de haplótipos de pontos de coleta distribuídos ao longo da América Central e do Sul.
- Subsidiar propostas de manejo e uso sustentável dos estoques de *Mugil* na sua área de distribuição, com vistas à sua aplicação em programas de cultivo e repovoamento, evitando assim o risco de contaminação genética pela introdução de amostras de diferentes populações.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

I. Material

3.1 Coleta e localidade das amostras

Foi amostrado um total de 85 indivíduos de *M. liza*, *M. platanus* (atualmente *M. liza*), *M. curema*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. incilis*, *M. rubrioculus* e *M. hospes* procedentes do Brasil, da Argentina, do Uruguai, da Venezuela e da Grécia (*M. cephalus*) (Fig.1). O anexo I apresenta a lista dos animais e as localidades de coletas das sete espécies do gênero *Mugil* analisados no presente estudo.

As identificações morfológicas dos espécimes foram realizadas empregando chaves de identificação com a ajuda de especialistas (Fig. 2).

Os tecidos foram retirados e conservados em etanol a 96% e posteriormente guardados no freezer para as análises. Tanto o tecido quanto representantes de cada população foram etiquetados e armazenados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, coleção credenciada pelo IBAMA como Fiel Depositária de Material de Componentes da Fauna Brasileira.



Figura 1. Mapas das coletas das amostras para o presente estudo. MI = *Mugil liza*, Mc = *M. curema*, Mr = *M. rubrioculus*, Mh = *M. hospes*, Mt = *M. trichodon*, Msp = *Mugil sp.*, Mce = *M. cephalus* (Mar Mediterrâneo - Grécia)

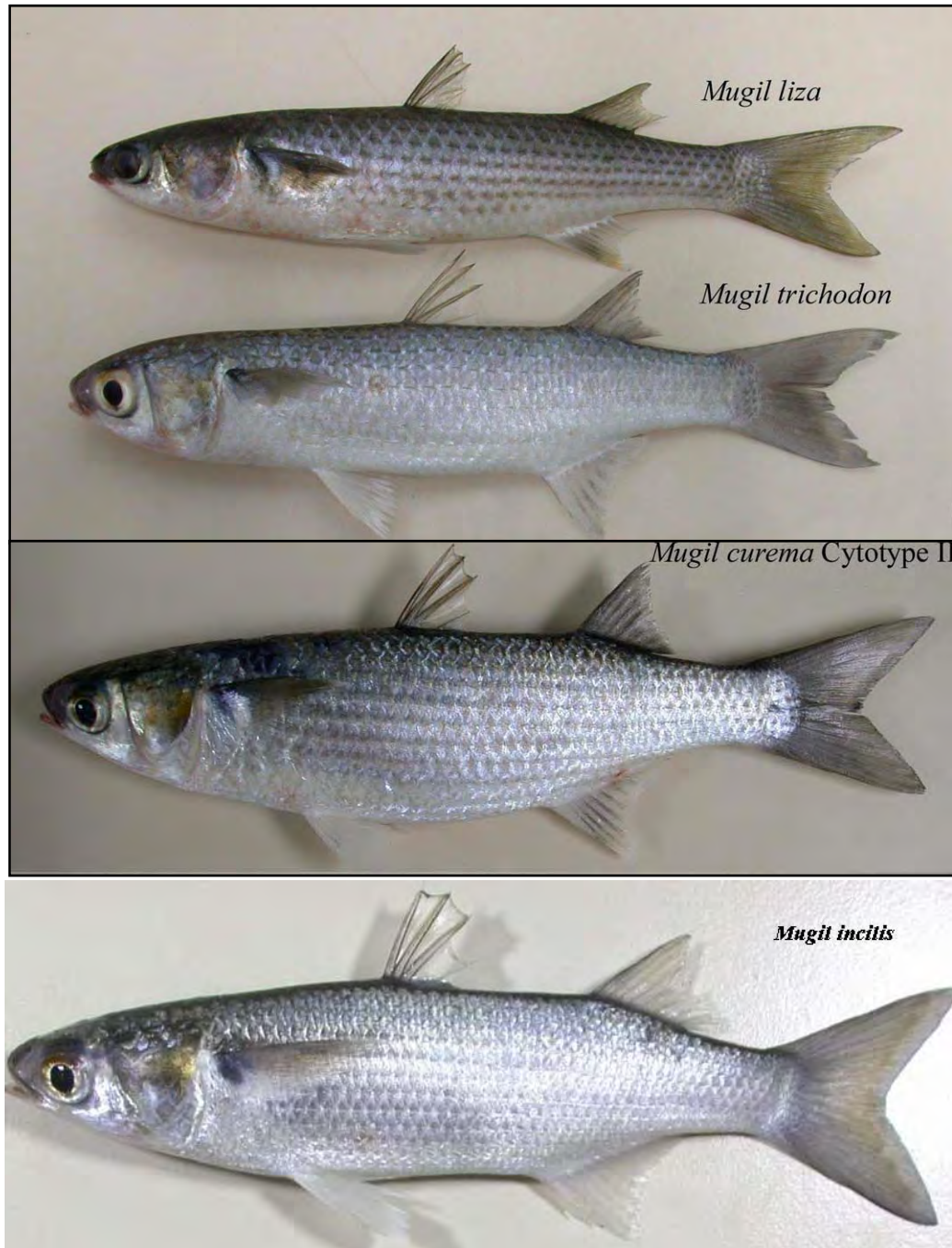


Figura 2. Alguns dos espécimes amostrados para este estudo.

II. Métodos

3.2 Extração de DNA genômico

O DNA total foi extraído de tecidos preservados em etanol 96%, utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. No. 69506).

1. Cortar um pedaço do tecido de cerca de 10 a 25mg. Retirar completamente o álcool em um papel de filtro. Colocar o tecido no tubo com 180µl de *Buffer* ATL.
2. Cortar o tecido em pequenos pedaços
3. Colocar 20µl de Proteinase K (10mg/ml). Transferir os tubos para um banho-maria a 56°C até digerir todo o material (1 a 3 horas).
4. Adicionar 200µl de *Buffer* AL e 200µl de etanol 100%.
5. Retirar todo o conteúdo do microtubo e colocar na coluna.
6. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar o tubo coletor.
7. Adicionar 500µl *Buffer* AW1 e colocar outro tubo coletor e centrifuga por 1 minuto a 8000rpm.
8. Adicionar 500µl *Buffer* AW2 e coloque outro tubo coletor e centrifuga por 3 minutos a 14.000rpm.
9. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5ml e adiciona 200µl de *Buffer* AE.
10. Incubar por 1 minuto e centrifugar por 1 minuto a 8000rpm.
11. Não é necessário esperar antes de usar o DNA.

A integridade do DNA foi checada em gel de agarose 1% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia). A quantidade de DNA foi avaliada por comparação comum marcador de peso molecular (*Low DNA Mass* – Invitrogen), mediante o programa computacional Kodak Digital Science 1D.

3.3 Amplificação dos genes

Para a amplificação dos fragmentos dos seis genes analisados das espécies empregadas no presente trabalho, utilizou-se a tecnologia da *Polymerase Chain Reaction*(PCR) e primers universais (ver tabela 2) e específicos desenhados a partir das sequências prévias publicadas por Calcagnotto *et al.* (2005). Alguns *primers* (Cytb NovoF e Cytb 08RN) foram desenvolvidos pelo Dr. Claudio de Oliveira e têm sido utilizados com sucesso em projetos de sequenciamento de diversos grupos de peixes.

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes.

Região e tamanho do fragmento	Nome do Primer	Sequência do Primer*	Referência
COI	Fish F1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	Ward <i>et al.</i> , (2005)
	Fish R1	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA'	Ward <i>et al.</i> , (2005)
CytB	Novo F	CCG GGC TTT TTC TAG CAA TAC	Oliveira C. (2009)
	08RN	GGT GAC CAA CGA ACT ATG	Oliveira C., 2009
16S rRNA	16S F	ACG CCT GTT TAT	Kocher <i>et al.</i> , (1989)

		CAA AAA CAT	
	16S R	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Kocher <i>et al.</i> , (1989)
12S rRNA	12SRNAF	AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA T	Oliveira C., (2009)
	12S rRNAR	GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT	Oliveira C., (2009)
ATP6-8	ATP8.2-L8331	AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC	S. McCafferty (Não publicado)
	COIII.2-H9236	GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT	S. McCafferty (Não publicado)

*Sentido 5´ - 3´

Para a amplificação foi empregada dois tipos de enzimas *Taq* polimerase, a GoTaq Polimerase (Promega) que já vem com o tampão, Buffer e dNTP em concentrações ótimas para a reação, e a Taq Platinum (Invitrogen) que os componentes estão separados.

Dois tipos de reações foram feitas para a amplificação de todos os genes analisados dependendo da enzima *Taq* polimerase que foi empregada (Tabela 3 e 4)

Tabela 3. Reação empregando a GoTaq

Reagentes	Volume
GoTaq (5U/ μ l)	6,30 μ l
Primer Forward (5uM)	0,50 μ l
Primer Reverse (5uM)	0,50 μ l
DNA Genômico	1,00 μ l
Água Milli-Q	4,05 μ l
Vo Final	12,35 μ l

Tabela 4. Reação empregando a *Taq* Platinum

Reagentes	Volume
Taq Platinum	0,10 μ l
Buffer 10X	1,25 μ l
MgCl ₂ (50mM)	0,25 μ l
dNTP (2mM)	0,20 μ l
Primer Forward (5uM)	0,50 μ l
Primer Reverse (5uM)	0,50 μ l
DNA Genômico	1,00 μ l
Água Milli-Q	8,57 μ l
Vo Total	12,50 μ l

As amplificações foram efetuadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) em que cada ciclo da técnica da PCR consiste, basicamente, da desnaturação, anelamento e extensão. Esses ciclos variaram dependendo do *primer* utilizado seguindo as condições básicas descritas pelos autores dos primers, porém ao longo do trabalho, esses ciclos sofreram adaptações para obter melhores resultados como mostra na tabela 5. A figura 3 mostra um esquema da molécula de mtDNA localizando as posições dos genes utilizados no presente estudo.

Tabela 5. Programas empregados na PCR para cada gene.

Passo	Processo	Temperatura					Tempo
1	Desnaturação inicial	COI	CytB	12S	16S	ATP6/8	2'
				rRNA	rRNA		
				94°C			
2	Desnaturação			94°C			30''
3	Anelamento	54°C	49°C	55°C	55°C	53°C	1'
				50°C	50°C		
				48°C	48°C	56°C	
				50°C	50°C		
4	Extensão			72°C			1'
5	Voltar ao passo 2						30x
6	Extensão final			72°C			7'

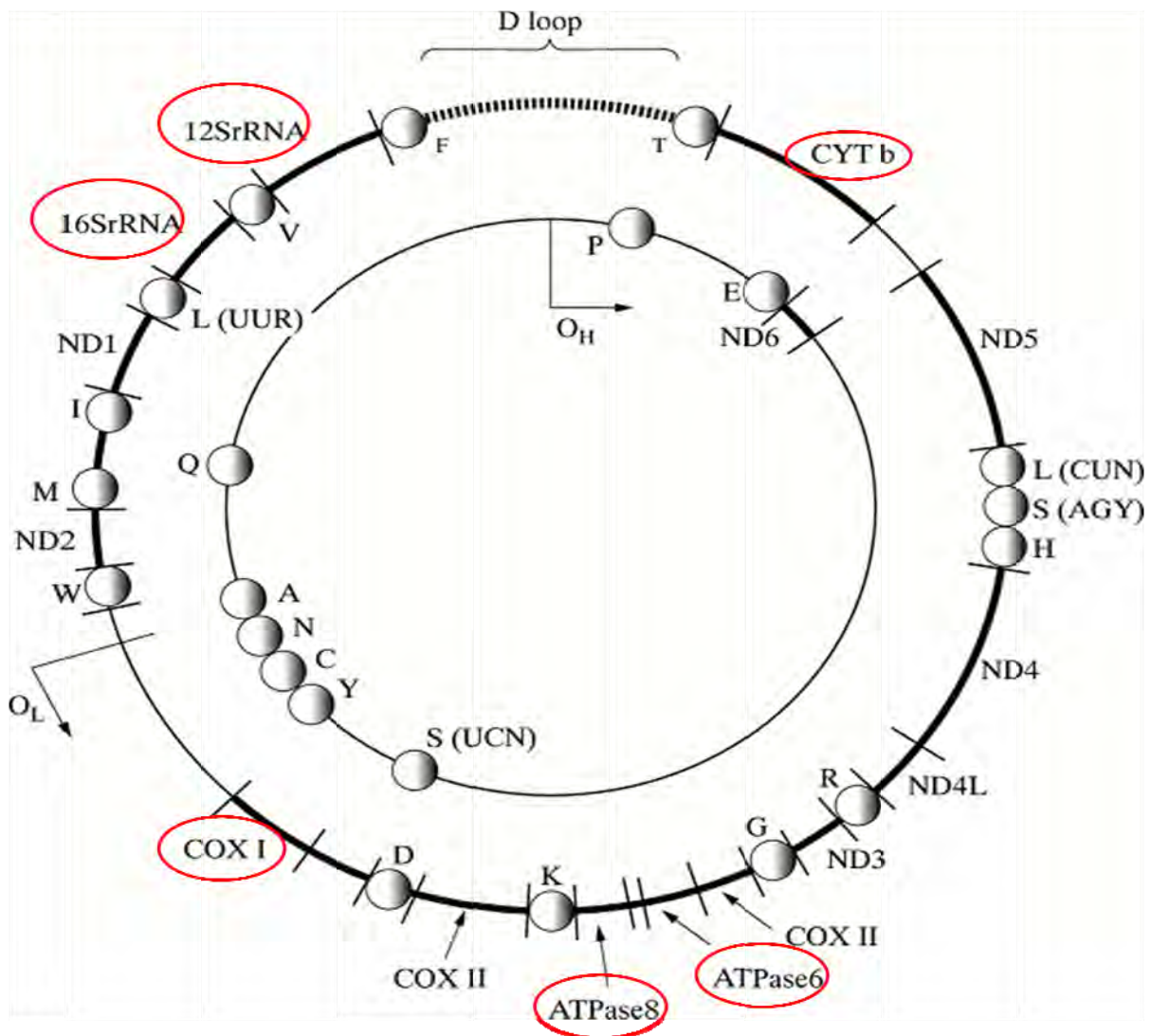


Figura 3. Esquema da molécula de mtDNA, mostrando a localização dos seis genes utilizados no presente estudo.

3.4 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose ao 1% (0,1g de agarose/1ml de tampão TAE 1X), corados com *Blue Green Loading Dye I* (*LGC Biotecnologia*) na proporção 1:1. O Blue Green é um reagente que une-se às fitas duplas do DNA emitindo coloração ao ser visualizado na luz UV, além de aumentar a densidade do DNA. Os produtos amplificados foram comparados com o ladder 1kb plus, para ver o tamanho molecular que as bandas tinham, foram visualizados no transiluminador e fotografados com a câmera digital como se pode observar na figura 4.

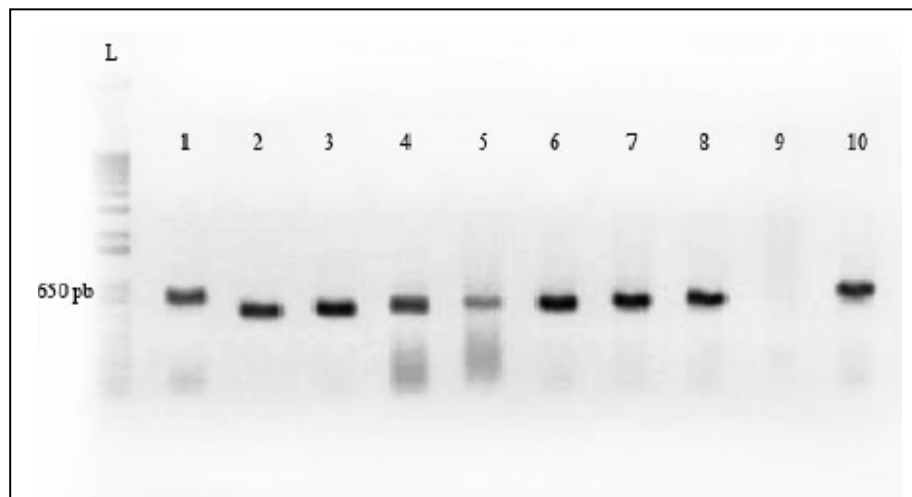


Figura 4. Fotografia do DNAs amplificados do gene COI evidenciando-se em um gel de agarose a 1.0% após da eletroforese, representando com bandas o resultado positivo de amplificações: “L” representa a região de “corrida” do *Ladder*. Os números representam

as amostras após cada reação. As bandas tiveram um peso molecular 650pb aproximadamente.

3.5 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza através do kit ExoSap-IT (USB Corporation) através do seguinte procedimento:

1: Em um microtubo prepara-se uma reação contendo 5,0 µl do DNA amplificado juntamente com 2,0 µl da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador, empregando o programa chamado Exosap, ver Tabela 6.

Tabela 6. Programa empregado na limpeza do PCR com ExoSap

Passo	Temperatura	Tempo
1	37°C	1 h
2	80°C	15m

3.6 Reação para PCR de Sequenciamento

Para a reação de PCR para sequenciamento foi utilizado o kit *Big Dye*TM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), como mostra a tabela 7. As condições dos ciclos de sequenciamento incluíam desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 4 minutos.

Tabela 7. Reação para PCR de Sequenciamento

Reagente	Volumem
Big Dye™ Terminator	0,70 µl
Buffer do Big Dye™ Terminator	1,05 µl
Primer F e R (5µM)	0,70 µl
DNA	1,40 µl
Água Milli-Q	3,50 µl
Volume total	7,00 µl

3.7 Limpeza do PCR de Sequenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de Acetato de Sodio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no spin brevemente;
4. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%;
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. Centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm a 25°C;
7. Descartar o Etanol em papel toalha;
8. Adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70% Gelado;
9. Centrifuga-se por 10':15" a 13000 rpm a 20°C;
10. Descartar o Etanol em papel toalha;
11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);
12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto;
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer a 4°C envolto em papel alumínio, ate o momento do sequenciamento;

3.8 Sequenciamento de DNA

As sequências foram obtidas através de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 (*Perking-Elmer*) do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

3.9. Obtenção de sequências consenso

As sequências obtidas dos genes 12S rRNA e 16S rRNA tanto para os produzidas pelo primers *Forward* e *Reverse* foram analisadas empregando os programas ATGC (Genetix Inc.), onde as sequências podem ser analisadas com a visualização simultânea do eletroferograma originário do processo de sequenciamento automático. Esse fato possibilita que as sequências consenso do gene sejam obtidas com um grau de precisão maior. Para os genes COI, CytB e ATP6/8 foi empregado o programa SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems) onde todas as sequências carregadas em uma pasta podem ser analisadas simultaneamente com a visualização dos eletroferogramas originários do processo de sequenciamento automático. Após essa etapa, as sequências consenso de cada indivíduo foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão txt).

4.0 Alinhamento das sequências e Análise dos dados

4.0.1 Alinhamento das sequências

Dois programas e algoritmos foram testados para se obter um alinhamento mais próximo do final, para que a matriz sofresse a menor interferência possível. Foram testados os programas DAMBE v.4.1.27(Xia e Xie, 2001) e BioEdit (Hall, 1999), com o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e o algoritmo MUSCLE, com o qual foram

gerados os melhores resultados. Os resultados foram salvados em formato Fasta para ser analisados no BioEdit, as mínimas correções das sequências (para não alterar os dados) foram feitas manualmente.

4.0.2 Análises dos dados

Uma matriz contendo a sequência dos seis genes foi elaborada, a ordem dos genes foi 12S rRNA, 16S rRNA, ATP 8, ATP6, COI e CytB.

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA v.4.0 (Kumar *et al.*, 2004). A saturação de nucleotídeos foi analisada plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética como uso do programa DAMBE v.4.1.27 (Xia e Xie, 2001). O programa Modeltest (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica (evolução genética) que melhor se ajustava aos dados obtidos. O modelo de substituição de nucleotídeos nos permite estimar como ocorreram as mudanças entre as sequências ao longo do tempo. Esse modelo envolve a estimativa do número de mudanças de caracteres que foram necessárias para a geração das sequências observadas e da probabilidade de ocorrência de cada um desses passos. Esse processo visa captar o processo evolutivo envolvido na geração das sequências. Para auxiliar na escolha de qual modelo se enquadra em nossa matriz de dados existem testes estatísticos que comparam os modelos, definindo qual é o mais adequado para os dados em questão. O Modeltest utiliza os testes de verossimilhança (Likelihood Ratio Test – LRT) e do critério de informação de Akaike (Akaike Information Criterion – AIC) para realizar diferentes comparações entre modelos hierárquicos, um mais simples e um mais complexo, de forma a encontrar o modelo mais simples que melhor represente os dados analisados. Como resultado,

fornece o modelo ideal para as amostras que se deseja analisar, como também os parâmetros que serão utilizados no programa que construirá a filogenia. Os modelos de substituição sugeridos pelo Modeltest são apresentados na tabela 8. Para uma estimação melhor de nossos dados a matriz foi particionada considerando a posição das bases nucleotídicas (1era, 2da e 3era posição) correspondendo às diferentes taxas mutacionais que cada posição apresenta.

As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se métodos de distância por Neighbour-joining, máxima verossimilhança e inferência bayesiana, que permitem o uso de modelos de evolução complexos no intuito de captar ao máximo as informações fornecidas pela matriz de dados. Os diferentes protocolos de análises foram usados, de maneira geral, para nossa matriz.

Método de distância Neighbour-joining

O princípio desse método é encontrar pares de unidades taxonômicas operacionais (UTO vizinhos) que minimizem o comprimento total dos ramos em cada fase do agrupamento de OTUs começando com uma árvore estelar. Os comprimentos dos ramos, bem como a topologia de uma árvore parcimoniosa pode rapidamente ser obtidos através deste método. O método de Neighbour-joining é usado de forma mais geral (Saitou, N. e Nei, M., 1987).

As análises filogenéticas baseadas por esse método foram realizadas com o programa MEGA v.4.0 (Kumar *et al.*, 2004). As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap*, com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Método probabilístico - Inferência Bayesiana (IB)

As análises probabilísticas de inferência bayesiana foram realizadas com o programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001; Ronquist e Huelsenbeck, 2003) via interação da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC).

Através da análise Bayesiana é possível estimar filogenias de uma grande quantidade de organismos em espaços de tempo relativamente pequenos quando comparado a outros métodos, além de calcular uma estimativa de confiabilidade dos ramos ao mesmo tempo em que realiza a inferência das árvores.

Foram usadas 3.000.000 de gerações, com quatro cadeias, com uma amostragem a cada 100 gerações. Foram excluídas as gerações anteriores à convergência das cadeias (*burn in* = 1.000.000) e uma árvore de consenso de maioria (50%) foi computada a partir das árvores amostradas depois da estabilidade encontrada. As probabilidades posteriores foram usadas como valores de suporte para os agrupamentos.

Método de Máxima Verossimilhança (ML)

O método de inferência filogenética por Máxima Verossimilhança observa um set de dados para um modelo de substituição específico maximizado para cada topologia, e a topologia com a maior probabilidade é escolhida como árvore final (Felsenstein, 1981; Nei e Kumar, 2000). A construção de árvores por ML é muito lenta, especialmente quando são utilizados modelos de substituição complexas (Piontkivska, 2004).

As análises de Máxima Verossimilhança foram efetuadas mediante um rápido algoritmo de *bootstrap* via estimação automática das cadeias no programa RaxML (Stamatakis A., 2006) como implementado no portal CIPRES v.1.15 (2010) <http://www.phylo.org/>.

4.0.3 Rede de haplótipos

A rede de haplótipos foi construída empregando a sequências de todos os indivíduos de *Mugil liza* tanto dos genes separados como dos genes unidos em uma única matriz, os indivíduos foram separados em diferente populações baseados na sua distribuição geográfica, porém se obtiveram três populações: Sul (amarelo), conformada por indivíduos da Argentina, do Uruguai e Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo no Brasil; a população do Norte (azul), formadas pelos indivíduos de Recife e Bahia no Brasil, e a população do Caribe (verde) formada pelo indivíduos da Ilha Margarita na Venezuela. A rede de haplótipos foi feita para observar se existem haplótipos compartilhados ou haplótipos característicos de cada população e conseguir observar ou não uma estruturação populacional. A construção desta rede foi com ajuda do programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005) e o programa Network v.4.5 Fluxus Technology Ltd., available at [http:// www.fluxus-technology.com/](http://www.fluxus-technology.com/)), assim como o DnaSP v.5.0 (Librado e Rozas, 2009).

Resultados

4. RESULTADOS

Foram sequenciados segmentos dos genes mitocondriais: Citocromo oxidase subunidade I (COI), Citocromo B (CytB), 16S rRNA, 12S rRNA, ATP sintetase 8 e ATP sintetase 6. O alinhamento final de todas as amostras sequenciadas resultou em uma matriz com 3362 caracteres.

4.1 Gene 12S rRNA

O tamanho consenso da sequência deste gene, depois de ser alinhado e submetido à correção manual, foi de 423pb, sendo 317pb conservados e 106pb variáveis. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 29,4% de adenina (A), 26,6% de citosina (C), 21,8% de guanina (G) e 22,2% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,990 e o valor de Tv foi de 0,910. Não foi observada a ocorrência de *gaps*.

4.2 Gene 16S rRNA

O tamanho consenso da sequência do gene 16S rRNA, foi de 609pb, sendo 492pb conservadas e 121pb variáveis. A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 28,7% de adenina (A), 27,1% de citosina (C), 22,0% de guanina (G) e 22,2% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,985 e para Tv foi de 0,944. Não foi observada a ocorrência de *gaps*.

4.3 Gene ATP Sintetase 8

O tamanho consenso da sequência do gene ATP Sintetase 8, foi de 117pb, sendo 65pb conservadas e 52pb variáveis. A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 23,4% de adenina (A), 32,7% de citosina (C), 14,8% de guanina (G) e 29,2% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,943 e para Tv foi de 0,571. Não foi observada a ocorrência de *gaps*.

4.4 Gene ATP Sintetase 6

O tamanho consenso da sequência do gene ATP Sintetase 6, foi de 579pb, sendo 356pb conservadas e 223pb variáveis. A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 26,5% de adenina (A), 33,5% de citosina (C), 12,0% de guanina (G) e 27,9% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,968 e para Tv foi de 0,879. Não foi observada a ocorrência de *gaps*.

4.5 Gene Citocromo Oxidase subunidade I

O tamanho consenso da sequência do gene COI, foi de 654pb, sendo 434pb conservadas e 220pb variáveis. A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 23,1% de adenina (A), 28,0% de citosina (C), 18,8% de guanina (G) e 30,1% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,988 e para Tv foi de 0,937. Não se observou a presença de *gaps* internos na sequência.

4.6 Gene Citocromo B

O tamanho consenso da sequência do gene Cytb, foi de 975pb, sendo 596pb conservadas e 379pb variáveis. A proporção de transição/ transversão (Ti/Tv) observada foi de 41,957. A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 23,4% de adenina (A), 32,7% de citosina (C), 14,8% de guanina (G) e 29,2% de timina (T).

Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos, o valor de R^2 para Ti foi de 0,936 e para Tv foi de 0,901. Não foi observada a ocorrência de *gaps* internos na sequência.

4.7 Elaboração da Matriz dos genes

Foram elaboradas seis matrizes independentes contendo sequências de genes diferentes. Foi construída também uma só matriz para todos os genes gerando 3362pb de sete espécies e 85 táxon terminais, desse total 2244pb são constantes, 1118pb são variáveis e informativas para análises de máxima parcimônia.

A composição média, em porcentagem de bases para este gene foi de 25,5% de adenina (A), 28,1% de citosina (C), 20,2% de guanina (G) e 26,2% de timina (T). O

valor de R^2 foi de 0,975 para as transversões e de 0,924 para as transições, indicando que não existe saturação nestes nucleotídeos.

A escolha do melhor modelo de distância genética para cada matriz foi realizada com o programa Modeltest v.3.06 (Posada e Crandall, 1998) e estão listados na tabela abaixo (Tabela 8).

Tabela 8. Modelo de distância genética selecionado no Modeltest.

Sequência Gênica	Modelo
12S	K80 + G
16S	TrN + G
ATP81st	K80 + G
ATP82nd	JC
ATP83rd	K80 + G
ATP61st	HKY + G
ATP62nd	TrN + G
ATP63rd	HKY
COI1st	TrN + G
COI2ndst	TIMef + G
COI3rd	F81
CYTB1st	K80 + G
CYTB2nd	F81 + G
CYTB3rd	TIM + G

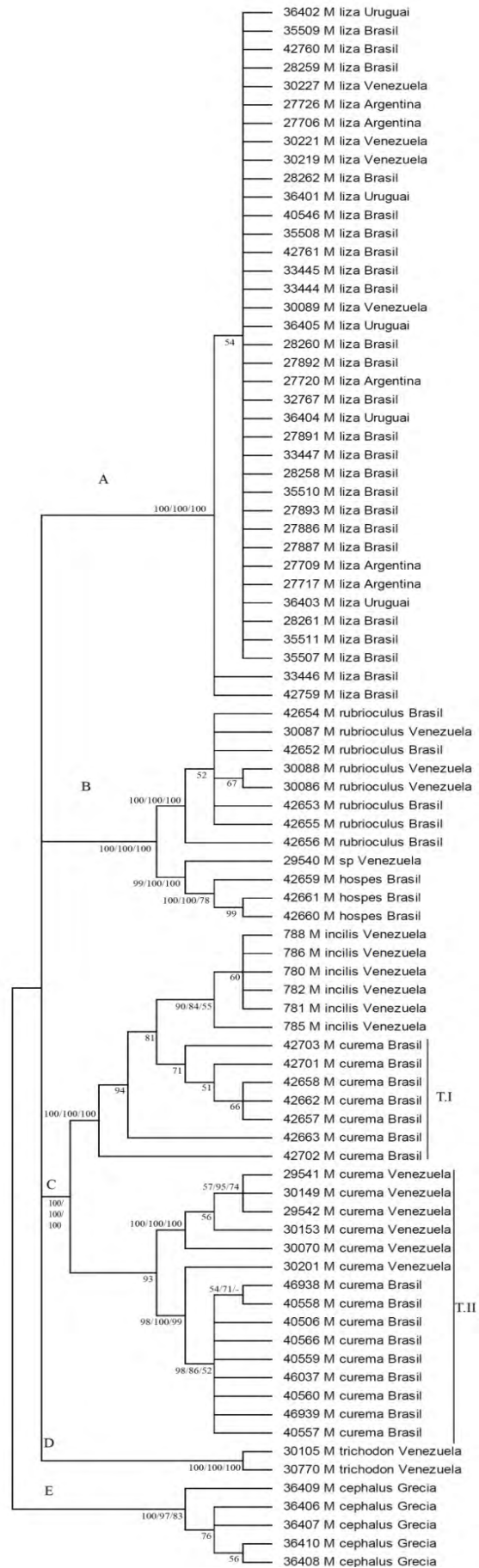
As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se os métodos: Probabilísticos de máxima verossimilhança (implementado no programa CIPRES Portal

www.phylo.org/sub_sections/portal/) e inferência bayesiana (empregando o programa MrBayes, Implementado no Paup*4.0b10, Sworfford, 2002) e distância de Neighbour-Joining (implementado no programa MEGA v.4.0, 2004). As topologias obtidas apresentaram-se iguais mostrando apenas que, na segunda análise, todos os suportes estatísticos apresentaram-se superiores, porém, para a construção da árvore consenso entre diferentes análises optamos pelo corte referente aos valores de *bootstrap* (50%) e não pelos valores de probabilidades posteriores oriundos da análise bayesiana.

Na topologia final (Fig.4) notamos a presença de sete clados suportados por um alto índice de *bootstrap* (98 -100%), que são compostos por: *Mugil liza*, *M. cephalus*, *M. trichodon*, *M. rubrioculus*, *M. curema*, *M. incilis* e *M. hospes*.

O maior clado, é composto de espécimes pertencentes a *Mugil liza* provenientes da Argentina, do Uruguai, do Brasil e da Venezuela, para o qual obteve-se um alto suporte estatístico (AD/ IB/ MV 100).

Figura 4. Árvore de consenso obtida entre os diferentes métodos de análise filogenética. Os números da direita para esquerda são: os valores de Probabilidade de máxima verossimilhança. Os intermediários as probabilidades *a posteriori* obtidas de 10.000.000 de gerações na inferência bayesiana. Os números da direita os valores obtidos através de 1.000 replicas de *bootstrap* da análise de Neighbour-Joining (valores abaixo de 50% não são mostrados).



4.8 Rede de haplótipos

Foram analisados 38 indivíduos pertencentes a *M. liza* dos quais encontramos 27 diferentes tipos de haplótipos. Haplótipos característicos dentro de cada população de *Mugil liza* não foram encontrados nas regiões compreendidas entre a costa do Caribe e da Argentina (Fig.5), sendo possível observar a existência de haplótipos misturados. A Figura 5 mostra a rede haplotípica formada pela matriz que envolve todos os genes sendo estes resultados correspondentes as análises geradas gene por gene.

As topologias observadas entre as árvores filogenéticas e as redes de haplótipos originadas a partir de todos os genes também evidenciaram os altos níveis de relacionamentos dentro de *Mugil liza* no Atlântico Sul e possibilitaram a visualização de um único clado com alto grau de significância nos valores de *bootstrap* nos ramos das árvores e nas redes haplotípicas com um número não significativo de passos mutacionais entre os haplótipos de *M. liza*.

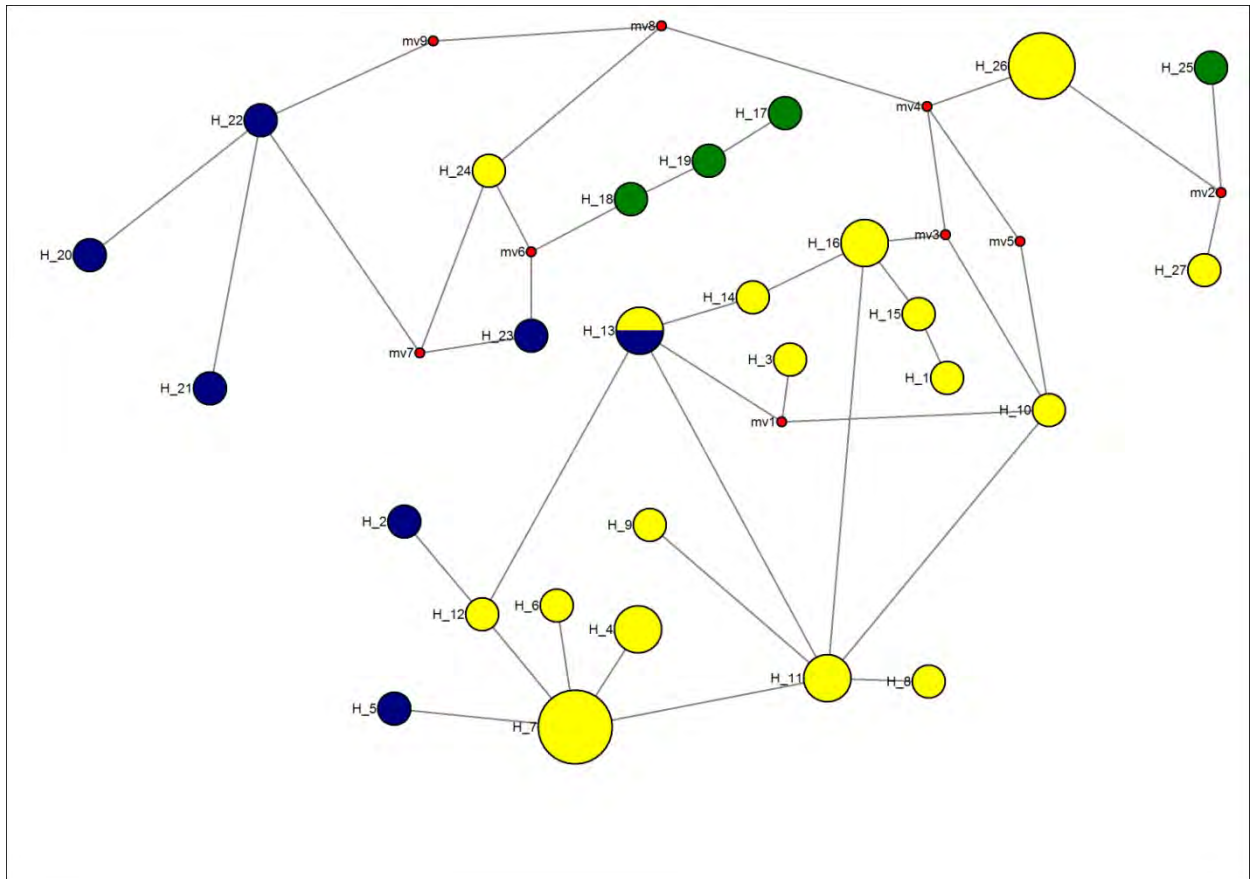


Figura 5. Rede de haplótipos das amostras de *Mugil liza* empregando os seis genes mitocondriais, construída com o programa Arlequin e o programa Network. Foram analisados 38 indivíduos, encontrando-se 27 diferentes haplótipos. Os haplótipos foram separados em três populações de acordo aos lugares de coleta, porém foram observadas populações do Sul (amarelo), formada pelos indivíduos da Argentina, do Uruguai e Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo no Brasil, a população do Norte (azul), formada pelos indivíduos de Recife e Bahia no Brasil, e a população do Caribe (verde) formada pelos indivíduos da Ilha Margarita na Venezuela. Os haplótipos em cor vermelho, são considerados como haplótipos hipotéticos, que servem de conexão entre um haplótipo e outro. O tamanho dos haplótipos dependeu da quantidade de espécimes que o compartilharam.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os seis genes analisados, apesar de terem taxas de evoluções diferentes, mostraram topologias de árvores semelhantes, sem diferenças significativas entre elas. Do mesmo modo, as análises filogenéticas empregadas (distância genética, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana) mostraram resultados muito semelhantes umas às outras, com índices de suporte iguais ou próximos a 100% para separação das espécies. Essa coerência entre os diferentes genes e os métodos de análise sugere uma consistência e uma boa resolução do conjunto de dados para o grupo nas análises filogenéticas. Todas as sete espécies analisadas foram separadas com os marcadores utilizados (Figura 4) e observou-se ainda a existência de várias linhagens de *M. curema* que serão discutidas abaixo.

O clado A em nossa árvore é composto apenas pela espécie *Mugil liza*. A média das distâncias genéticas dos seis genes analisados para as populações dessa espécie foi de 0%. Esse valor é muito baixo com relação à média de divergência genética entre diferentes espécies na matriz analisada que é de 16,93%. Valdez-Moreno *et al.* (2009) sugere que valores de divergência genética abaixo de 2% correspondem a populações de uma mesma espécie. Assim esses dados sugerem que a espécie *M. liza* representa uma única espécie e não um complexo já sinonimizada a espécie *M. platanus* (ver Anexo 2 para tabelas de divergência genética). Alguns autores também sugerem que *M. liza* e *M. platanus* formam uma única espécie pelas grandes similaridades morfológicas e por ter o mesmo número diplóide de 48 cromossomos (Nirchio *et al.*, 2001). Assim, com base nesses resultados podemos confirmar a hipótese proposta por Fraga *et al.* (2007), Heras *et al.* (2009) e Menezes *et al.* (2010), segundo a qual *M. platanus* e *M. liza* são uma única espécie. Assim, como proposto por Menezes *et al.* (2010), o nome

válido para a espécie fica sendo *Mugil liza* Valenciennes 1836. Assim, todas nossas amostras de *M. platanus* devem ser reconhecidas como *M. liza*.

A área de distribuição da espécie *Mugil liza* (sinônimo *Mugil platanus*) tem sua distribuição desde o Caribe até a Argentina na América do Sul. Essa área engloba distintas regiões filogeográficas (Santos *et al.* 2006) e algumas barreiras naturais ao fluxo gênico para muitas espécies marinhas, como a sedimentação despejada pelo Rio Amazonas no Oceano e a Corrente do Brasil que chega na região do estado de Pernambuco (Rocha *et al.* 2008, Robertson *et al.* 2006).

As águas superficiais do Atlântico sudoeste são dominadas pela presença de duas grandes correntes, a corrente das Malvinas e a corrente do Brasil. A corrente do Brasil se origina como um braço da corrente Sul Equatorial e corre em direção aos pólos quase paralela a plataforma continental. É de origem tropical, por isso é salina, quente e relativamente oligotrófica (Bisbal, 1995). Olson *et al.* (1988) descreve o Sul como o limite das águas quentes associadas com a corrente do Brasil que oscila entre os 38°S-46°S, e é acompanhada pela formação intermitente de um núcleo quente, redemoinhos anti-ciclônicos. Garzoli e Giulivi (1994) descreveram como o encontro entre o fluxo quente que vai em direção ao Sul da corrente do Brasil e o fluxo frio em direção ao Norte da corrente das Malvinas, aproximadamente a 38°S se produz uma forte frente termohalina. A confluência das correntes do Brasil e a das Malvinas é reconhecida como uma das características mais dinâmicas dos oceanos do mundo. A localização e movimento das massas de águas envolvidas, a corrente das Malvinas, corrente do Brasil e a corrente costeira, geram distintas áreas filogeográficas na paisagem Atlântica da América do Sul. Essas paisagens podem funcionar muitas vezes como barreiras físicas para muitas espécies, já que as diferentes paisagens filogeográficas apresentam características distintas quanto a salinidade de água, temperatura e proliferação de

fitoplâncton (Robertson *et al.* 2006; Santos *et al.* 2008). Essas características, por sua vez, podem ter um papel importante na distribuição das espécies ou mesmo nas diferentes populações das espécies.

As saídas dos Rios Amazonas e Orinoco para o mar podem funcionar como uma barreira e tem importante função na distribuição da fauna superficial nos recifes entre o Brasil e o Caribe (Robertson *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2002; Rocha, 2003), dispersão e construção de recifes de coral (Cox e Moore, 2000), gastrópodes da costa rochosa (Vermeij, 1978) e peixes de recifes de águas superficiais (Gilbert, 1972).

Apesar disso, essas correntes aparentemente não funcionam como uma barreira para *Mugil liza* e para outras espécies desse gênero, sendo que, a média de divergência genética intraespecífica para *M. liza* e de 0%. Houve uma mistura dos haplótipos das populações das regiões analisadas sugerindo a falta de estruturação populacional entre as populações dessa espécie, e conseqüentemente falta de correspondência filogeográfica dos haplótipos. Isso sugere um alto fluxo genético entre estas populações, tal como o manifestado por Heras *et al.* (2009). Assim acreditamos que, uma história evolutiva independente não pode ser impregnada no material genético no que se acreditava, até pouco tempo, como espécies *Mugil liza* e *M. platanus*. Esse fato tem feito com que *Mugil liza* se mantenha como uma única espécie, como conhecido atualmente. Isso nos sugere que os peixes pelágicos não têm uma barreira geográfica eficiente, como ocorre no ambiente terrestre e com os peixes de água doce, existe um maior fluxo gênico tornando menos evidente a existência de estruturação populacional. Exemplos provenientes da Venezuela, os quais passam toda sua vida dentro da mesma lagoa (Nirchio, observação pessoal), são similares geneticamente aos animais provenientes do Uruguai. Isso nos faz pensar que *M. liza* é um peixe com uma maior capacidade de tolerância fisiológica e resistência a diferentes meios ambientes do que

outros peixes, sendo capaz de se reproduzir em diferentes regiões filogeográficas estendendo-se desde o Caribe até a Argentina. Isto tem demonstrado que a barreira do Amazonas, a barreira formada pela corrente Sul Equatorial e as diferentes áreas filogeográficas definidas segundo Santos *et al.* (2006) são mais fracas do que se pensava anteriormente para esses peixes.

Ainda que os mugilídeos tenham uma ampla distribuição na América do Sul e no Caribe nossos dados sugerem que *Mugil liza* não corresponde a um complexo de espécies nem mesmo, segundo nossos dados a diferentes populações, mas sim a uma única população distribuída por toda uma imensa área. Essa distribuição pode ser explicada pela sua alta capacidade migratória e por não existir uma barreira física ou uma mudança ambiental drástica que funcionasse como uma barreira eficiente. Nossa hipótese não corrobora com muitos autores segundo o qual o período das glaciações do Pleistoceno deve ter sido preponderante para moldar os padrões filogeográficos expressos no DNA mitocondrial e na estrutura populacional de espécies de peixes marinhos (Brunner *et al.* 2001; Planes *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002; Grunwald *et al.* 2002).

A árvore filogenética final foi enraizada na espécie *Mugil cephalus*, clado E da Figura 4. Segundo nossos dados essa espécie é distinta de *M. liza*, apesar da difícil diferenciação dessas espécies do ponto de vista morfológico, sendo que ambas aparecem em posições distintas na árvore filogenética e a média da distância genética entre os genes analisados entre ambas as espécies é de 19,5%. Quando analisamos o gene COI a divergência genética entre as duas espécies é de 21,8% sendo que a divergência genética intraespecífica de *M. liza* é de 0% e de *M. cephalus* de 0,2%. Segundo Hebert *et al.* (2004) o limite do valor de corte para diferenciação entre duas espécies em DNA barcode deve ser 10x maior que o valor intraespecífico. Quando

enraizamos a árvore em qualquer outro grupo que não seja *M. liza*, *M. trichodon* e *M. cephalus* observamos que estas últimas aparecem como espécies irmãs e as duas juntas irmãs de *M. liza*. Isso sugere que essas três espécies compartilham uma história evolutiva em comum, mas ainda assim se mantendo como espécies distintas. Estes resultados não corroboram os achados de Heras *et al.* (2009) que sugeriram que *M. platanus* e *M. liza* poderiam ser sinônimos de *M. cephalus* e outros autores como Fraga *et al.* (2007) e Eiras-Stofella *et al.* (2001), que reconheciam uma alta similaridade entre estas espécies, o primeiro sobre aspecto de DNA mitocondrial e o segundo sobre aspecto morfológico.

O clado B é formado pelas espécies *M. rubrioculus*, *M. hospes* e uma espécie não identificada da Venezuela *Mugil* sp. A espécie *M. rubrioculus* foi coletada tanto na Venezuela quanto no Brasil, formando grupo irmão com as outras duas. A diversidade genética intraespecífica encontrada para essa espécie foi de 0,3%. Segundo o trabalho de Fraga *et al.* (2007) a espécie *M. hospes* forma grupo irmão de *M. curema* tipo I, diferentemente do encontrado em nossos trabalho. O que nós acreditamos corresponder a *M. curema* tipo I em nossos dados (amostras da Venezuela e Brasil) é irmão de *M. curema* tipo II (outras amostras do Brasil) mais *M. incilis*. Entretanto Fraga *et al.* (2007) não inseriu em suas análises a espécie *M. rubrioculus* e no presente trabalho a relação entre os clados A, B, C e D é de politomia, sendo impossível de determinar a correta relação entre os grandes grupos de espécies analisados.

O clado C é composto pelas espécies *Mugil incilis*, *M. curema* tipo I e *M. curema* tipo II segundo correspondência com a determinação de Fraga *et al.* (2007). Estes autores encontraram em simpatria duas linhagens de *M. curema* (tipo I e tipo II) indistinguíveis morfológicamente. *Mugil curema* tipo II, em nossa árvore representada

por amostras apenas do Brasil, se encontra mais intimamente relacionada com *M. incilis* (Figura 4). *Mugil curema* tipo I, espécie com amostras da Venezuela e Brasil, forma clado irmão com a espécie *Mugil curema* tipo I mais *M. incilis*. Com relação a este último agrupamento as espécies do Brasil e da Venezuela encontra-se formando dois unidades relativamente distintas e irmãs, a única exceção é a amostra 30201 que encontra-se mais relacionada com os exemplares do Brasil do que com os da Venezuela. Nirchio *et al.* (2003 e 2007) observou a presença de três subgrupos diferentes baseados em diferenças cariotípicas e aloenzimáticas em *Mugil curema*, e Heras *et al.* (2009) observando a presença de três tipos diferentes de *M. curema* provenientes de amostras do Brasil, do Estados Unidos e da Argentina formando clados independentes relacionados entre si, baseado em análise de DNA mitocondrial. Assim aparentemente a espécie *Mugil curema* é um complexo de espécies e precisa ser explorado cuidadosamente, já que três diferentes linhagens geneticamente distintas de *M. curema* podem coexistir nas águas do Atlântico (Heras *et al.*, 2009). Segundo Knowlton (1993) esta situação provavelmente existe com muitas espécies, talvez com maior quantidade em espécies de peixes marinhos.

Conclusão

6. CONCLUSÕES

As análises neste trabalho permitem concluir que:

- Nossos resultados demonstram a eficácia dos genes analisados para identificar diferentes espécies de mugilídeos.
- Mesmo utilizando seis genes mitocondriais, com diferentes taxas de evolução, não foi possível observar uma estruturação populacional dentro do clado formado por *Mugil liza* e *M. platanus*.
- As altas similaridades morfológicas e de sequências de DNA de todos os exemplares dentro de *Mugil liza* e *M. platanus* reforçam a hipótese de que uma única população é encontrada em toda a costa leste da América do Sul e o Caribe e que estas por sua vez são diferentes de *M. cephalus* do mar Mediterrâneo.
- A grande similaridade genética entre as amostras de *Mugil liza* e *M. platanus* indica um alto grau de fluxo gênico que estas apresentam, mesmo possuindo uma ampla distribuição pelo Oceano Atlântico.
- As barreiras geográficas marinhas existentes no Atlântico não são significantes para *Mugil liza* e *M. platanus*.
- Não existe uma correlação geográfica entre as amostras de *Mugil liza* e *M. platanus* e o grau de polimorfismo que apresentam.
- *Mugil cephalus* é uma espécie distinta de todas as analisadas neste estudo, não tendo sido capturado nenhum exemplar desta espécie neste estudo na costa da América do Sul.

- Há um complexo de espécies dentro de *M. curema* que necessita ser melhor investigado em futuros estudos.
- Do nosso ponto de vista uma maior quantidade de informação é requerida para planejar um melhor manejo pesqueiro destas espécies na costa Brasileira.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- Almirón, A.E., S.E. Gómez, N.I. Toresani.** 1992. Peces de agua dulce de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas provincia de Buenos Aires. 2 12: 1-29.
- Alves-Gomes, J.Á., Ortí, G., Haygood, M., Meyer, M., Heiligenberg, W.** 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes Order Gymnotiformes and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12: p. 298-318.
- Alves-Gomes, J.A.** 1998. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi, Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. p. 447-460.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H., Fagundes, L.** 1999. Sistema Gerenciador de Banco de Dados de Controle Estatístico de Produção Pesqueira Marítima – ProPesq. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 11., Congresso Latinoamericano de Engenharia de Pesca, 1., Recife, 17-21/out./1999. p. 824-832.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H.** 2003a Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2000. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 11: 1-14.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H.** 2003b Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2001. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 12: 1-14.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H., Mendonça, J.T., Servo, G.J.M., Bastos, G.C.C.** 2004a. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2002. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 14: 1-17.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H., Mendonça, J.T., Servo, G.J.M., Bastos,**

- G.C.C., Okubo da Silva, S., Sakamoto, M.S.** 2004b. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2003. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 15: 1-19.
- Ávila da Silva, A.O., Carneiro, M.H., Mendça J.T., Servo, G.J.M., Bastos, G.C.C., Okubo da Silva, S., Sakamoto, M.S.** 2005. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2004. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 20: 1-40.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J.C.** 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans Roy Soc London B.* 312: 325-342.
- Avise, J.C.** 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* New York: Chapman., Hall.
- Avise, J.C.** 2000. *Phylogeography: the history and formation of species.* Harvard University Press, London.
- Ball, S.L., Hebert, P.D.N., Burian, S.K., Webb, J.M.** 2005. Biological identifications of mayflies Ephemeroptera using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society.* 24:508–524.
- Bechenbach, A.T., Thomas, W.K., Soharabi, H.** 1990. Intraspecific sequenci variation and mitochondrial genome of raibow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Genome.* 33:13-15.

- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., Briscoe, D.A.** 2002. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 269, 65–73.
- Beheregaray, L.B., Ciofi, C., Caccone, A., Gibbs, J.P., Powell, J.R.** 2003. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos Islands. Conservation Genetics, 4: 31–46.
- Bermingham, E., Avise, J.C.,** 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. Genetics 113, 939–965.
- Bermingham, E, Martin, A.P.** 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. Molecular Ecology. 7: 499-517
- Billington, N., Hebert, P.** 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Can. J. Fish. Aquat. Sci. suppl. 1: 80-94.
- Bisbal, G.** 1995. The Southeast South American shelf large marine ecosystem. Marine Policy, 19, 21–38.
- Bonhomme, F., Naciri, M., Bahri-Sfar, L., Lemaire, C.** 2002. Comparative analysis of genetic structure of 2 species of marine fish *Dicentrarchus labrax* and *Dicentrarchus punctatus*. C R Biol 325:213-20
- Brown, B.L., Chapman, R.W.** 1991. Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish *Fundulus heteroclitus*. Evolution. 45:1147-1161.
- Brown, T. A.** 1999. Genética – um enfoque molecular. 3ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 336 pp.

- Brunner, P.C., Douglas, M.R., Asinov, A., Wilson, C.C., Bernatchez, L.** 2001. Holarctic phylogeography of Arctic char *Salvelinus alpinus* L. inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 55: 573–586.
- Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colombo, L., Patarnello, T.,** 1996: Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intramily level. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6: 416–424
- Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colombo, L., Patarnello, T.,** 1996: Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intramily level. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6: 416–424.
- Camhi, M., Fowler, S, Musick, J., Fordham, F.S.** 1998. Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 20-39.
- Cardona, L.** 2006. Habitat selection by grey mullets Osteichthyes: Mugilidae. In Mediterranean estuaries: The role of salinity. *Scientia Marina*, 703: 433–455.
- Carneiro, M.H., Fagundes, L., Ávila da Silva, A.O., Servo, G.J.M.** 2000. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo 1998-1999. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 1: 1-11.
- Carvalho, G.R., Hauser, L.** 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fisheries and Fish Biology*, 4: 326-350
- Castro- Aguirre, J L., Espinosa, H., Schmitter-Soto, J.J.** 1999. Ictiofauna estuarino lagunar y vicaria de México. Noriega-Limusa, México, 249p.

- Castro-González, M., Heras, S., Cousseau, M.B., Roldán, M.I.** 2008. Assessing species validity of *Mugil platanus* Günther, 1880 in relation to *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Actinopterygii). *Italian Journal of Zoology*, 75, 319–325
- Cardoso, Y. P. and J. I. Montoya-Burgos.** 2009. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology* 18/(5):947–964
- Cataudella, S., Civitelli, M.V., Capanna, E.** 1974. Chromosome complement of Mediterranean mullets Pisces, Perciformes. *Caryologia* 27: 93-105.
- Cervigón, F.** 1993. Los Peces Marinos de Venezuela. V.II, 2nd edn. Fundación Científica Los Roques, Caracas, Venezuela.
- Cervigón, F., Capriani, F., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A. J., Márquez, R., Poutiers, J. M., Robaina, G., Rodriguez, B.** 1993. FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine and brackishwater resources of the northern coast of South America, FAO, Rome.
- Chao, L.H., Pereira, L.E., Vieira, J. P.** 1985. Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study. In: Yanez-Arancibia, A. ed. *Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration*. DR R. UNAM Press, Mexico, pp 429-450.
- Churikov, D.M., Matsouka, X., Luan, A.K., Gray, V.A., Brykov, A.J.** 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon genus *Oncorhynchus*. *Molecular Ecology* 10: 2329- 2339.

- Cortey, M., Pla C., Garcia-Marin J.C.** 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 831-844
- Cousseau, M.B., Castro, M.G., Figueroa, D.E., Gosztonyi, A.E.** 2005. Does *Mugil liza* Valenciennes 1836 Teleostei: Mugiliformes. occur in Argentinean waters? *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 402., 133–140.
- Cox, C.B., Moore, P.D.** 2000. Biogeography: an ecological and evolutionary approach, 6th edn, p. 298. Blackwell Science, Oxford.
- Crosetti, D., Avise, J.C., Placidi, F., Rossi, A.R., Sola, L.** 1993. Geographic variability in the grey mullet *Mugil cephalus*: preliminary results of mtDNA and chromosome analyses. *Aquaculture* 111: 95-101.
- Delgado, J.V., Molina, A., Lobillo, J., Alonso, A., Camacho, M.E.** 1992. Morphometrical study on the chromosomes of three species of mullet Teleostei: Mugilidae. *Caryologia*, 45: 263-271.
- Dodson, J.J., Tremblay, S., Colombani, F., Carscadden, J.E., Lecomte, F.** 2007. Trans-Arctic dispersals and the evolution of a circumpolar marine fish species complex, the capelin *Mallotus villosus*. *Molecular Ecology*, 16: 5030-5043.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** 2005. Arlequín ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Eiras-Stofella D.R., Charvet-Almeida, P., Fanta, E., Vianna, A.C.** 2001. Surface ultrastructure of the gills of the mullets *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* Mugilidae, Pisces. *J Morphol* 2:122–133
- Falk, T.M., Teugels, G.G., Abban, E.K., Villwock, W., Renwranz, L.** 2003. Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex

- Teleostei, Cichlidae. from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 81-92.
- FAO**, 2005. Fishery Statistics. <http://www.fao.org/fi/statist>.
- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M.V.** 2002. The breeding biology of lemon sharks at a tropical nursery lagoon. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269:1655–1661.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution*, 35: 1229-1242.
- Ferris, S.D., Sage, S.D., Huang, C.M., Nielsen, J.T., Ritte, U., Wilson, A.C.** 1983. Flow of mitochondrial DNA across species boundary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:2290-2294.
- Fraga, Schneider, H., Nirchio, M., Santa-Brigida, E., Rodrigues-Filho L.F., Sampaio, I.** 2007. Molecular phylogenetic analyses of Mulletts Mugilidae, Mugiliformes based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.* 23: 598–604.
- Froese, R., Pauly D.** 2004. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org
- Froufe, E., Alekseyev, S., Knizhin, I., Weiss, S.** 2005. Comparative mtDNA sequence control region, ATPase 6 and NADH-1 divergence in *Hucho taimen* Pallas across four Siberian river basins. *Journal of Fish Biology* 2005 67, 1040–1053
- Galetti, P.M. Jr., Aguilar, C.T., Molina, W.F.** 2000. An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420: 55-62.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. Wilson, A.C.** 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, 32: 128-144.

- Galetti, P.M.Jr., Aguilar, C.T., Molina, W.F.** 2000. An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420, 55–62
- Garzoli, S., Giulivi, C.** 1994. What forces the variability of the southwestern Atlantic boundary Currents? *Deep-Sea Research*, 41: 1527–1550.
- Gasalla, M.A., Servo, G.J.M., Tomás, A. R. G.** 2003. Dinâmica da frota de traineiras da região de Santos, SP. In Cergole, M. C. e Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. Coords. 2003. Análise das principais pescarias comerciais do sudeste-sul do Brasil: Dinâmica das frotas pesqueiras. Editora Evoluir, SP. p.227-249.
- Gilbert, C.R.** 1972. Characteristics of the western Atlantic reef-fish fauna. *Quart.J.Fla.Acad.Sci.* 35 :130-144.
- Graves, J.E.** 1998 Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89: 427–437.
- Greenfield, D.W., Thomerson, J.E.** 1997. Fishes of the continental waters of Belize. 1997: iii–xxiii+1–311.
- Grunwald, C., Stabile, J., Waldman, J.R., Gross, R., Wirgin, I.** 2002 Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, **11**, 1885–1898.
- Günther, A.** 1880. A contribution to the knowledge of the fish fauna of the Río de la Plata. *Annals and Magazine of Natural History*, 5.7, 7–13.
- Haig, S.M.** 1998. Molecular contribution conservation. *Ecology*, 79:413-425.
- Haimovici, M., Castello, J. P., Vooren, C. M.** 1996. Fisheries. In: Seeliger, U., Harrison, I.J., Howes, G.J. 1991. The pharyngobranchial organ of mugilid fishes, its structure, variability, ontogeny, possible function and taxonomic utility. *Bulletin of British Museum Natural History Zoology*. 57: 111-132.

- Harrison I.J., Howes, G.J.** 1991. The pharyngobranchial organ of mugilid fishes; its structure, variability, ontogeny, possible function and taxonomic utility. *Bulletin of British Museum Natural History (Zoology)* 57: 111-132.
- Harrison, I.J.** 1999. "Mugilidae" in *FAO Species Identification Guide for Fisheries Purposes. The living Marine Resources of the Western Central Pacific, Vol. 4. Bony Fishes, Part 2, Mugilidae to Carangidae.*, edited by K. Carpenter and V. H. Neim. Rome: FAO.
- Harrison, I. J.** 2003. Mugilidae. In *The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 8* (Miller, P. J.,ed.), pp. 1–42. Wiebelsheim: AULA-Verlag.
- Harrison, I.J., Nirchio, M., Oliveira, C., Pérez, J., Gaviria, J., Ron, E.** 2007. A new species of mullet Teleostei: Mugilidae. from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *J. Fish Biol.* 71 Suppl A.: 76-97.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hebert, P.D.N., Stoecklem M.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M.** 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2(10) e312.
- Heras, S., Roldán, M.I., Castro, M.G.** 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Rev Fish Biol Fisheries* 19:217–231.
- Herzberg, A., Pasteur, R.** 1975. The identification of grey mullet species by disc electrophoresis. *Aquaculture*, 5: 99-106.
- Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C.** 1996. *Applications of Molecular Systematics*. In: *Molecular systematics*. Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. editors. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hoese, H.D.** 1985. Jumping mullet the internal living bell hypothesis. *Emv. Biol. Fish.* 13: 309-314.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny, *Bioinformatics* 17:754-755.
- Imsiridou, A., Minos, G., Katsares, V., Karaiskou, N., Tsiora A.** 2007. Genetic identification and phylogenetic inferences in different Mugilidae species using 5S rDNA markers. *Aquaculture Research* 38: 1370-1379.
- Irwin, D.M., Wilson, A.C.** 1990. Concerted evolution of ruminant stomach lysozymes. Characterization of lysozyme cDNA clones from sheep and deer. *J. Biol. Chem.* 265:4944-4952.
- Kartavtsev, Y.P., Lee, J.S.** 2006. Analysis of nucleotide diversity at genes Cyt-b and Co-1 on population, species, and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in the genetics of speciation. *Genetika* 42:437-461
- Knowlton, N.** 1993. Sibling species in the sea. *Annu Rev Ecol Syst* 24:189-216.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C.** 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,86: 6196-6200.
- Kocher, T.D., Stepien, C.A.** 1997. *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K.
- Kotlik, P., Berrebi, P.** 2002 Genetic subdivision and biogeography of the Dubian rheophilic barb *Barbus peteneyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24:10-18.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M.** 2001. MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. *Bioinformatics*.

- Kuusipalo, L.** 1999. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* Centropomidae, Pisces population in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia* 407:141-148.
- Jesus, J., Harris, D.J., Brehm, A.** 2005. Phylogeography of *Mabuya maculilabris* Reptilia from São Tomé Island Gulf of Guinea inferred from mtDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 503-510.
- Jordão, L.C., Oliveira, C., Foresti, F., Godinho, H.** 1992. Caracterização citogenética da tainha, *Mugil platanus* Pisces, Mugilidae. *Boletim do Instituto de Pesca São Paulo* 19: 63-66.
- Lacy, R.C., Lindenmayer, D.A.** 1995. A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum, *Trichosurus caninus* Ogilby Phalangeridae: Marsupialia, in south-eastern Australia. I. Demographic stability and population persistence. *Biological Conservation* 73:119-129.
- Leaché, A.D., Mulcahy, D.G.** 2007. Phylogeny, divergence times and species limits of spiny lizards *Sceloporus magister* species group in western North American deserts and Baja California. *Molecular Ecology* 16: 5216-5233.
- LeGrande, W.H., Fitzsimons, J.M.** 1976. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *Mugil cephalus* Perciformes: Mugilidae. from Louisiana. *Copeia* 1976: 388-391.
- Lessa, R.P.T.** 1986 Contribuição ao conhecimento da biologia de *Carcharhinus porosus* Ranzani, 1839 Pisces, Chondrichthyes das reentrâncias maranhenses. *Acta Amazônica*, 16/17: 73-86.
- Levy, J.A., Cassano, V.P.F.** 1994. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* Teleostei: Perciformes: Scianidae in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107 B 4: 515-517

- Lewin, B.** 1994. Genes V. Oxford University Press Inc., New York.
- Lewin, B.** 1994. Genes VIII. Oxford University Press Inc., New York.
- Li, M., Wei, F., Goossens, B., Feng, Z., et al.** 2005. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda *Ailurus fulgens*: implications for conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 78-89.
- Librado, P., Rozas, J.** 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- López, H.L., Miquelarena, A.M., Menni, R.C.** 2003. Lista comentada de los peces continentales de la Argentina. *ProBiota. Serie Técnica y Didáctica*, 5., 1–85.
- Ludt, C.J., Schroeder, W., Rottmann, O., Kuehn, R.** 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer *Cervus elaphus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1064-1083.
- McDowall, R.M.** 1988. *Diadromy in fishes*. London: Croom Helm.
- McDowall, R.M.** 2007. On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. *Fish and Fisheries* 8:1–13.
- McEachran, J.D., Fechhelm, J.D.** 1998. Fishes of the Gulf of Mexico. Volume 1: Myxiniiformes to Gasterosteiformes. University of Texas Press, Austin. 1112p.
- Machida, R.J., Tsuda, A.** 2010. Dissimilarity of Species and Forms of Planktonic Neocalanus Copepods Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. *PLoS ONE* 54. Doi: 10.1371
- McCafferty, W. P., Meyer, M.D., Lester, G.T.** 2002. Significant range extensions for southwestern Nearctic mayflies Ephemeroptera: Baetidae. *Entomological News* 113: 211-214.
- Martin, A.P., Palumbi, S.R.** 1993. Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 10: 873-891.

- Maitland, P.S., Campbell, R.N.** 1992. Freshwater fishes of the British Isles. HarperCollins Publishers, London. 368 p.
- Mendonça, F.F., Hashimoto, D.T., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Gadig, O.B.F., Foresti, F.** 2009. Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* Elasmobranchii, Carcharhinidae by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Molecular Ecology Resources* 9,771-773
- Menezes, N.A.** 1983. Guia Prático para Conhecimento e Identificação das Tainhas e Paratis Pisces, Mugilidae. do Litoral Brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 1: 1–12.
- Menezes, N.A., Figueiredo, J.L.** 1985. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil V. Teleostei 4. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Menezes, M.R., Martins, M., Naik, S.** 1992. Interspecific genetic divergence in grey mullets from the Goa region. *Aquaculture* 105: 117-129
- Menezes, N.A., Buckup, P.A., Figueiredo, J.L., Moura, R.L.** 2003. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Museu de Zoologia USP, São Paulo.
- Menezes N.A., Oliveira C., Nirchio M.** 2010. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet Teleostei: Perciformes: Mugilidae. *Zootaxa* 2519: 59–68
- Menni, R. C., Ringuet, R.A., Arámburu, R.H.** 1984. Peces marinos de la Argentina y Uruguay. Ed. Hemisferio Sur S.A. 360 pp. Argentina.
- Menni, R.C., Hazin, F. H., Lessa, R. P. T.** Occurrence of the night hark *Carcharhinus signatus* and the pelagic stingray *Dasyatis violacea* off northeastern Brazil. *Neotropica*, v. 41, n. 1056-106, p. 105-110, 1995.
- Menni, R.C.** 2004. Peces y ambientes en la Argentina. Monografias del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Buenos Aires, 5: 1–316.

- Meyer, A.** 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes, Ch 1, in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Hochachka and Mommsen Ed., p. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Miranda, L.V., Mendça, J.T., Cercole, M.C.** 2006. Diagnóstico do estoque e da região sudeste-sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração – II. Série Documentos REVIZEE – Score Sul. São Paulo, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. p.38-48.
- Miranda L.V., Carneir, M.H.** 2007. A pesca da tainha *Mugil platanus* Perciformes: Mugilidae. desembarcada no estado de São Paulo subsídio ao ordenamento. Sér. Relat. Téc. n. 30
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M.** 1987. Evolution of animals mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Eol Syst.* 18:269-292.
- Nei, M., Kumar, S.** 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York 333 pp
- Nelson, J.S.** 1994. Fishes of the World. Third edition. John Wiley and Sons, INC. N. York, ISBN 0-471-5713-1.
- Nelson, J.S.** 2006. Fishes of the world. 4rd edition, John Wiley ., Sons., Inc., New York, USA.
- Nirchio, M., González, D., Pérez, J.E.** 2001. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *Mugil liza* Pises: Mugilidae.: Regiones organizadoras del nucleolo. Bol. Instit. Oceanográfico de Venezuela 40: 3–7.
- Nirchio, M., Cervigón, F., Porto, J.I.R., Pérez, J.E., Gómez, J.A., Villalaz, J.** 2003. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus*

- Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. *Sci. Mar.* 67, 113–115.
- Nirchio, M., Cipriano, R., Cestari, M., Fenocchio, A.** 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae). *Neotrop. Ichthyol.* 3, 99–102.
- Nirchio, M., Oliveira, C., Ferreira, I.A., Pérez, J.E., Gaviria, J.I., Harrison, I., Rossi, A.R., Sola, L.** 2007. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* Teleostei: Mugilidae. from Venezuela. *Interciencia* 32:757-762.
- Nirchio, M., Oliveira, C., Ferreira, I.A., Martins.C., Rossi, A.R., Sola, L.** 2009. Classical and molecular cytogenetic characterization of *Agonostomus monticola*, a primitive species of Mugilidae Mugiliformes. *Genetica* 135:1–5.
- Olson, D., Podesta, G., Evans, R., Brown, O.** 1988. Temporal variations in the separation of the Brazil and Falkland Currents. *Deep-Sea Research*, 35, 1971–1990.
- Ong, T-L., Stabile, J., Wirgin, I., Waldman, J.R.** 1996. Genetic divergence between *Acipenser oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as assessed by mitochondrial sequencing analysis. *Copeia*. 464-469.
- Ortí, G., Petry, P., Porto, J.I.R., Jégo, M., Meyer, A.** 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Molecular Evolution* 42: 169-182.
- Palumbi, S.R.** 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Anu. Ev. Ecol. Syst.* 25: 547
- Palumbi, S.R.** 1996. *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*. Pp. 205 - 247.

- In: Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B Eds..Molecular Systematics 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts,655 pp.
- Papasotiropoulos, V., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G., Alahiotis, S.** 2001. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets Teleostei: Mugilidae. using allozyme data. *Biochem. Genet.* 39: 155–168
- Pardini, A.T., Jones, C.S., Noble, L.R.** 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412:139–140.
- Patarnello, T., Marcato, S., Zane, L., Varotto, V., Bargelloni, L.** 2003. Microevolutionary processes into the Southern Ocean: relationships within and between species in the genus *Chionodraco* Notothenioidei Channichthyidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28, 420–429.
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I.** 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* Teleostei: Pimelodidae. in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25: 172-189.
- Perdices, A., Cunha, C., Coelho, M.M.** 2004. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* Teleostei, Cyprinidae. populations on the upper and middle Chang Jiang =Yangtze. drainage inferred from cytochrome b sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31:192-203.
- Perdices, A., Sayanda, D., Coelho, M.M.** 2005. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* Teleostei, Cyprinidae. in three Chinese drainages. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 920-927.

- Pestano, J., Brown, R.P.** 1999. Geographical structuring of mtDNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266, 815–823.
- Piontkivska, H.** 2004. Efficiencies of maximum likelihood method of phylogenetic inferences when different substitution models are used. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31:865-873.
- Planes, S., Doherty, P.J., Bernardi, G.** 2001 Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Evolution* 55: 2263–2273.
- Posada, D., Crandall, K. A.** 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Purdom, C.E.** 1993. *Genetics and Fish breeding*. Chapman and Hall editors. London.
- Reis, E.G., D'Incao, F.** 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. *OceanCoast. Manage.*, 43:585-595.
- Ringuelet, R.A., Aramburu, R.A.** 1960. Peces marinos de la República Argentina. *Agro-Publicacion Técnica*, 5., 1–141.
- Ringuelet, R.A. , Aramburu, R.A** 1961. Peces argentinos de agua dulce. *Agro-Publicacion Técnica*, 7., 1–98.
- Ringuelet, R.A., Aramburu, R.H., Aramburu, A.A.** 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica Provincia de Buenos Aires (CIC). Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina. 602 pp.
- Rivas, L.R.** 1980. Synopsis of knowledge on the taxonomy, biology, distribution, and fishery of the Gulf of México mullets *Pisces: Mugilidae.*, *in*: Flandorfer, M and L. Skupien eds. “Proceedings” of a workshop for potential fishery resources of the

- northern Gulf of Mexico, pp. 34–53, New Orleans, LA: Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium. Publ. MASGP-80-012.
- Robertson, B.C., Chilvers, B.L., Duignan, P.J., Wilkinson, I.S., Gemmell, N.J.** 2006. Dispersal of breeding, adult male *Phocarcos hookeri*: Implications for disease transmission, population management and species recovery. *Biological Conservation* 127:227-236.
- Rocha, L.A.** 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography* 30: 1161–1171.
- Rocha, L.A., Bass A.L., Robertson D.R., Bowen B.W.** 2002 Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes Teleostei: Acanthuridae. *Molecular Ecology* 11:243–252.
- Rocha L.A, Rocha, C.R., Robertson, D.R., Bowen, B.W.** 2008. Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC Evolutionary Biology* 8:157
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rossi, A. R., Crosetti, D., Gornung, E., Sola, L.** 1996: Cytogenetic analysis of global populations of *Mugil cephalus* striped mullet. by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Heredity* 76, 77–82.
- Rossi, A.R., Gornung, E., Crosetti, D.** 1997. Cytogenetic analysis of *Liza ramada* (Pisces: Perciformes) by different staining techniques and fluorescent in situ hibridation. *Heredity* 79: 83-87
- Rossi A.R., Capula M., Crosetti D., Campton D.E., Sola L.** 1998. Genetic divergence and phylogenetic inferences in øve species of Mugilidae Pisces: Perciformes. *Marine Biology* 131: 213-218.

- Saitoh, K., Miya, M., Inoue, J.G., Ishiguro, N.B., Nishida, M.** 2003 Mitochondrial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J Mol Evol.* 56:464-472.
- Saitou, N., Nei, M.** 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* Jul,44.:406-25.
- Saleh, M.A.** 2006. *Mugil cephalus*, Cultured Aquatic Species Information Program. Inland Water Resources and Aquaculture Service FIRI., FAO.
- Saleh, M.A.** 2008. Capture-based aquaculture of mullets in Egypt. In A. Lovatelli and P.F. Holthus eds. Capture-based aquaculture. Global overview. FAO Fisheries Technical Paper. No. 508. Rome, FAO. pp. 109–126.
- Sanetra, M., Crozier, R.H.** 2003. Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 12: 2281-2295.
- Santos, S., Hrbek, T., Farias, I.P., Schneider, H., Sampaio, I.** 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* Sciaenidae, in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology* 15, 4361–4373
- Schrey, A.W., Heist, E.J.** 2003. Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako *Isurus oxyrinchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 60:670–675.
- Schultz, L.P.** 1946. A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae, with descriptions of three new genera. *Proc. United States Nat. Mus.* 96: 377-395.
- Schultz, L.P.** 1953. Mugilidae. In: *Fishes of the Marshall and Marianas islands, Voll.* Smithsonian Institution United States National Museum, Bulletin 202, United States Government Printing Office, Washington.

- Schultz, M.B., Ierodionou, D.A., Smith, S.A., Horwitz, P., Richardson, A.M.M., Crandall, K.A., Austin, C.M.** 2008. Sea-level changes and palaeo-ranges: reconstruction of ancient shorelines and river drainages and the phylogeography of the Australian land crayfish *Engaeus sericatus* Clark Decapoda: Parastacidae. *Molecular Ecology* 17: 5291-5314.
- Seckendorff, R.W., Azevedo, V.G.** 2007. Abordagem histórica da pesca da tainha *Mugil platanus* e do parati *Mugil curema* Perciformes: Mugilidae. no litoral norte do Estado de São Paulo. *Série Relatórios Técnicos, São Paulo*, 28: 1-8.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G.** 2001 Population structure and geography of migratory freshwater fishes *Prochilodus*: Characiformes in major South American rivers. *Molecular Ecology*. 10: 407-417.
- Slatkin, M.** 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin, M.** 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Smith, M.M., Smith, J.L.B.** 1986. "Mugilidae" in *Smith's Sea Fisheries*, edited by M.M. Smith and P. C. Heemstra. Berlin: Springer-Verlag.
- Smith-Vaniz, W.F., Collette, B.B. ., Luckhurst, B.E.** 1999. Fishes of Bermuda: history, zoogeography, annotated checklist, and identification keys. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication No. 4: i-x+1-424, 1-12.
- Souza, F.L., Cunha, A.F., Teixeira, M.A., Pereira, G.A.G., Reis, S.F.** 2003. Preliminary phylogeographic analysis of the neotropical freshwater turtle *Hydromedusa maximiliani* Chelidae. *J. Herpet.* 37: 199-205.

- Sola, L., Gornung, E., Mannarelli, M.E., Rossi, A.R.** 2007. Chromosomal evolution in Mugilidae, Mugilomorpha: an overview. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. eds. Fish cytogenetics. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp 165 - 194.
- Stamatakis, A.** 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J.** 2006. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol.* 55:758–771
- Stepien, C.A., Faber, J.E.** 1998. Population genetic structure, Phylogeography and spawning philopatry in walleye *Stizostedion vitreum* from mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology.* 7: 1757-1769.
- Strecker, A.L., Cobb, T.P., Vinebrooke, R.D.** 2004 Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fish less alpine ponds. *Limnology and Oceanography.* 49:1182–1190.
- Szymura, J.M., Spolsky, C., Uzzell, T.** 1986. Concordant change in mitochondrial and nuclear gene in a hybridzone between two frog species genus *Bombina*. *Experientia.* 41:1469-1470.
- Thacker, C.E.** 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes Teleostei: Perciformes: Gobioidi. *Mol Phylogenet Evol.* 26: 354-368.
- Thangaraj, M., Lipton, A.P.** 2010. Genetic Identity of Three Indian Populations of Three Spotted Seahorse, *Hippocampus trimaculatus* *Advances in Biological Research* 41: 37-41.
- Thomson, J.M.** 1954. The Mugilidae of Australia and adjacent seas. *Aus. J. Mar. Freshwater Res.* 5: 70-131.

- Thomson, J.M.** 1963. A bibliography of systematic references to the grey mullets Mugilidae. Technical Paper. Division of Fisheries and Oceanography. CSIRO Australia, No 16.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673 - 4680
- Thomson, J.M.** 1997. The Mugilidae of the world. Mem. Queensl. Mus. 41, 457–562.
- Valdéz-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., Hebert, P.D.N.** 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*. 74: 377–402.
- Vazzoler, A.E.A., Lizama, M.A.P., Cohen, M.R.G.** 1990. Caracterização bioquímica das tainhas *Mugil sp.* da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 17: 37–52
- Vermeij, G.J.** 1978. Biogeography and adaptation: patterns of marine life, p. 332. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Vieira, J.P.** 1991. Juvenile mullets Pisces: Mugilidae. in the estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 1991:409-418.
- Vieira, J.P., Scalabrin, C.** 1991. Migração reprodutiva da “Tainha” *Mugil platanus*, Günther, 1880 no sul do Brasil. *Atlântica*, Rio Grande 13: 131-141.
- Vieira, J.P., Castello, J.P.** 1996. Fish fauna. In: Seeliger, U., Odebrecht, C. and Castello, J. P. eds. Subtropical convergence marine ecosystem. The coast and the sea in the warm temperate southwestern atlantic. Springer Verlag, New York, pp 56-61.

- Wang, W.** 2004. WRF Version 2 modeling system user's guide. http://www.mmm.ucar.edu/wrf/users/docs/user_guide/. 2004.
- Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F.** 1992. Cadernos de ictiogenética 1: conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: Coordenadoria de Comunicação Social, Universidade de São Paulo. 1:17-29.
- Ward, R.D., Elliott, N.G., Grewe, P.M.** 1995. Allozyme and mitochondrial DNA separation of Pacific northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis* (Temminck and Schlegel), from southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). Aust. J.mar. Freshwat. Res. 46: 921–930.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N.** 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, pp. 1-11.
- Xia, X., Xie, Z.** 2001: DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J. Hered. 92, 371–373.
- Zemplak, T.S., Habit, E.M., Walde, S.J., Battini, M.A., Adams, E.D.M., Ruzzante, D.E.** 2008. Across the southern Andes on fin: glacial refugia drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. Molecular Ecology, 17: 5049-5061.

Anexos

ANEXO I

Relação de espécies empregadas no presente estudo e suas respectivas localidades.

Pais	LBP	Amostra	Espécie	Drenagem	Localidade
		28259	<i>M.liza</i>		
		28258	<i>M.liza</i>		
Brasil	5806	28260	<i>M.liza</i>	Praia da pinheira	Palhoça/SC
		28261	<i>M.liza</i>		
		28262	<i>M.liza</i>		
		32767	<i>M.liza</i>		
		33444	<i>M.liza</i>		
Brasil	6849	33445	<i>M.liza</i>	Porto Seguro /Ba	Porto Seguro /Ba
		33446	<i>M.liza</i>		
		33447	<i>M.liza</i>		
		27886	<i>M.liza</i>		
		27887	<i>M.liza</i>		
Brasil	6023	27891	<i>M.liza</i>	Rio Grande	Rio Grande /RS
		27892	<i>M.liza</i>		
		27893	<i>M.liza</i>		
		27706	<i>M.liza</i>		
		27709	<i>M.liza</i>		

Anexo I

Argentina	6279	27717	<i>M.liza</i>	Litoral Argentino	San clemente del Tuyu / Buenos aires
		27720	<i>M.liza</i>		
		27726	<i>M.liza</i>		
		35507	<i>M.liza</i>		
		35508	<i>M.liza</i>		
Brasil	7572	35509	<i>M.liza</i>	Cananéia	Cananéia/SP
		35510	<i>M.liza</i>		
		35511	<i>M.liza</i>		
		30889	<i>M.liza</i>		
		30219	<i>M.liza</i>		
Venezuela	6064	30221	<i>M.liza</i>	Ilha Margarita	Boca del Río/ Nova Esparta
		30227	<i>M.liza</i>		
		36401	<i>M.platanus</i>		
		36402	<i>M.platanus</i>		
Urugai	5671	36403	<i>M.platanus</i>	Laguna de castillos	Água Dulces
		36404	<i>M.platanus</i>		
		36405	<i>M.platanus</i>		
		36406	<i>M.cephalus</i>		
		36407	<i>M.cephalus</i>		

Anexo I

Grécia	6848	36408	<i>M.cephalus</i>	Grécia	Grécia
		36409	<i>M.cephalus</i>		
		36410	<i>M.cephalus</i>		
		30086	<i>M.rubrioculus</i>		
Venezuela	6063	30087	<i>M.rubrioculus</i>	Ilha Margarita	Boca del Río/ Nova Esparta
		30088	<i>M.rubrioculus</i>		
		30070	<i>M.curema</i>		
Venezuela	6065	30149	<i>M.curema</i>	Ilha Margarita	Boca del Río/ Nova Esparta
		30153	<i>M.curema</i>		
Venezuela	6129	29541	<i>M.curema</i>	Golfo de Venezuela	San Bernardo/Zulia
		29542	<i>M.curema</i>		
Venezuela	6066	30105	<i>M.trichodon</i>	Ilha Margarita	La Restinga/ Nova Esparta
		30770	<i>M.trichodon</i>		
Venezuela	6128	29540	<i>M.sp</i>	Golfo de Venezuela	San Bernardo/Zulia
		42652	<i>M.rubrioculus</i>		
		42653	<i>M.rubrioculus</i>		

Anexo I

		42654	<i>M.rubrioculus</i>		
		42655	<i>M.rubrioculus</i>		
Brasil	9060	42656	<i>M.rubrioculus</i>	Foz do rio Caeté	Bragança /PA
		42657	<i>M.curema</i>		
		42658	<i>M.curema</i>		
		42659	<i>M.hospes</i>		
		42660	<i>M.hospes</i>		
		42661	<i>M.hospes</i>		
		42662	<i>M.curema</i>		
Brasil	9059	42663	<i>M.curema</i>	Foz do amazonas	Vigia /PA
		42701	<i>M.curema</i>		
Brasil		42702	<i>M.curema</i>		PA
		42703	<i>M.curema</i>		
		42759	<i>M.liza</i>		
Brasil	9108	42760	<i>M.liza</i>	Recife	Recife / PE
		42761	<i>M.liza</i>		
		40506	<i>M.curema</i>		
		40546	<i>M.liza</i>		
		40566	<i>M.curema</i>		
		40557	<i>M.curema</i>		

Anexo I

Brasil	40558	<i>M.curema</i>	Guaruyá /SP
	40559	<i>M.curema</i>	
	40560	<i>M.curema</i>	
	46937	<i>M.liza</i>	
	46938	<i>M.curema</i>	
	46939	<i>M.curema</i>	

ANEXO II

1. MATRIZ COM OS SEIS GENES

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,001	0,001
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0,001	0,001
<i>M. curema</i>	0,042	0,004
<i>M. incilis</i>	0,001	0
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,003	0,001
<i>M.hospes</i>	0,006	0,002

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M. cephalus</i>		0,018	0,016	0,016	0,017	0,016	0,016	0,014
2. <i>M. liza</i>	0,195		0,016	0,015	0,017	0,016	0,015	0,016
3. <i>M. trichodon</i>	0,168	0,166		0,013	0,015	0,013	0,014	0,014
4. <i>M. curema</i>	0,178	0,170	0,154		0,006	0,013	0,013	0,013
5. <i>M. incilis</i>	0,175	0,177	0,162	0,048		0,014	0,015	0,015
6. <i>M. sp</i>	0,181	0,187	0,140	0,150	0,158		0,011	0,008
7. <i>M. rubrioculus</i>	0,179	0,175	0,152	0,144	0,158	0,091		0,009
8. <i>M. hospes</i>	0,165	0,182	0,155	0,152	0,163	0,055	0,072	

Distancia intra-específica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,001	0,001
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0,001	0,001
<i>M.incilis</i>	0,001	0,000
<i>M. curema</i> Brasil I	0,005	0,001
<i>M. curema</i> Venezuela II	0,021	0,003
<i>M. curema</i> Brasil III	0,004	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,003	0,001
<i>M.hospes</i>	0,006	0,002

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>M. cephalus</i>		0,017	0,015	0,016	0,017	0,016	0,016	0,016	0,015	0,014
2. <i>M. liza</i>	0,195		0,016	0,017	0,017	0,015	0,015	0,016	0,015	0,016
3. <i>M. trichodon</i>	0,168	0,166		0,015	0,015	0,013	0,014	0,013	0,014	0,014
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,175	0,176	0,160		0,002	0,008	0,008	0,014	0,015	0,015
5. <i>M. incilis</i>	0,175	0,177	0,162	0,005		0,008	0,008	0,014	0,015	0,015
6. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,180	0,170	0,148	0,070	0,072		0,005	0,013	0,012	0,014
7. <i>M. curema</i> Brasil III	0,179	0,166	0,153	0,067	0,066	0,038		0,014	0,013	0,014
8. <i>M. sp</i>	0,181	0,187	0,140	0,158	0,158	0,142	0,150		0,011	0,008
9. <i>M. rubrioculus</i>	0,179	0,175	0,152	0,161	0,158	0,132	0,140	0,091		0,009
10. <i>M. hospes</i>	0,165	0,182	0,155	0,166	0,163	0,145	0,145	0,055	0,072	

2. GENE 12S rRNA

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0,010	0,002
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i>	0,032	0,006
<i>M. incilis</i>	0,001	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,001	0,001
<i>M. hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M. cephalus</i>		0,018	0,018	0,018	0,020	0,019	0,019	0,021
2. <i>M. liza</i>	0,123		0,017	0,018	0,019	0,019	0,017	0,017
3. <i>M. trichodon</i>	0,128	0,113		0,016	0,018	0,015	0,015	0,016

4. <i>M. curema</i>	0,135	0,134	0,121		0,007	0,017	0,016	0,017
5. <i>M. incilis</i>	0,143	0,137	0,120	0,035		0,018	0,017	0,018
6. <i>M. sp</i>	0,138	0,131	0,096	0,131	0,124		0,009	0,009
7. <i>M. rubrioculus</i>	0,123	0,111	0,096	0,116	0,112	0,035		0,009
8. <i>M. hospes</i>	0,147	0,119	0,102	0,130	0,126	0,033	0,035	

Distancia intraespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0,010	0,002
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i> Brasil I	0,001	0,001
<i>M. incilis</i>	0,001	0,001
<i>M. curema</i> Venezuela II	0	0
<i>M. curema</i> Brasil III	0,002	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,001	0,001
<i>M. hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>M. cephalus</i>		0,017	0,018	0,020	0,020	0,018	0,019	0,019	0,019	0,020
2. <i>M. liza</i>	0,123		0,017	0,019	0,019	0,018	0,019	0,018	0,017	0,017
3. <i>M. trichodon</i>	0,128	0,113		0,017	0,017	0,017	0,018	0,015	0,015	0,016
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,140	0,137	0,117		0,002	0,010	0,012	0,019	0,017	0,019
5. <i>M. incilis</i>	0,143	0,137	0,120	0,003		0,010	0,011	0,018	0,017	0,019
6. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,126	0,126	0,119	0,041	0,043		0,009	0,018	0,017	0,018
7. <i>M. curema</i> Brasil III	0,137	0,137	0,125	0,058	0,055	0,034		0,019	0,018	0,019
8. <i>M. sp</i>	0,138	0,131	0,096	0,127	0,124	0,125	0,138		0,009	0,009
9. <i>M. rubrioculus</i>	0,123	0,111	0,096	0,113	0,112	0,108	0,123	0,035		0,009
10. <i>M. hospes</i>	0,147	0,119	0,102	0,126	0,126	0,123	0,137	0,033	0,035	

3. GENE 16S

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i>	0,035	0,006
<i>M. incilis</i>	0	0
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M. hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M. cephalus</i>		0,021	0,018	0,018	0,019	0,018	0,019	0,017
2. <i>M. liza</i>	0,159		0,018	0,019	0,020	0,020	0,020	0,021
3. <i>M. trichodon</i>	0,124	0,123		0,015	0,017	0,015	0,016	0,015
4. <i>M. curema</i>	0,141	0,155	0,104		0,008	0,015	0,013	0,014
5. <i>M. incilis</i>	0,141	0,157	0,118	0,044		0,018	0,018	0,017
6. <i>M. sp</i>	0,126	0,150	0,083	0,098	0,121		0,009	0,007
7. <i>M. rubrioculus</i>	0,126	0,158	0,092	0,085	0,112	0,033		0,007
8. <i>M. hospes</i>	0,117	0,160	0,083	0,086	0,109	0,018	0,020	

Distancia intraespecífica incluindo as três linhagens de *M. curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i> Brasil I	0,001	0,001
<i>M. incilis</i>	0	0
<i>M. curema</i> Venezuela II	0,008	0,003

<i>M. curema</i> Brasil III	0,001	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M.hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

1. <i>M. cephalus</i>										
2. <i>M. liza</i>	0,159									
3. <i>M. trichodon</i>	0,124	0,123								
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,142	0,157	0,119							
5. <i>M. incilis</i>	0,141	0,157	0,118	0,001						
6. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,136	0,153	0,090	0,060	0,060					
7. <i>M. curema</i> Brasil III	0,143	0,155	0,102	0,067	0,067	0,020				
8. <i>M. sp</i>	0,126	0,150	0,083	0,122	0,121	0,077	0,093			
9. <i>M. rubrioculus</i>	0,126	0,158	0,092	0,113	0,112	0,063	0,078	0,033		
10. <i>M. hospes</i>	0,117	0,160	0,083	0,110	0,109	0,065	0,081	0,018	0,020	

4. Gene ATPase 6

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,001	0,001
<i>M. liza</i>	0,001	0,001
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i>	0,07	0,008
<i>M. sp</i>		
<i>M. rubrioculus</i>	0,001	0,001
<i>M. hospes</i>	0,002	0,002

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>M. cephalus</i>		0,024	0,024	0,023	0,027	0,027	0,027
2. <i>M. liza</i>	0,237		0,019	0,018	0,021	0,019	0,021
3. <i>M. trichodon</i>	0,254	0,162		0,021	0,022	0,021	0,021
4. <i>M. curema</i>	0,268	0,185	0,214		0,020	0,018	0,021
5. <i>M. sp</i>	0,279	0,188	0,213	0,216		0,019	0,014
6. <i>M. rubrioculus</i>	0,271	0,173	0,199	0,188	0,163		0,019
7. <i>M. hospes</i>	0,297	0,203	0,203	0,218	0,097	0,162	

Distancia intraespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,001	0,001
<i>M. liza</i>	0,001	0,001
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i> Brasil I	0,002	0,001
<i>M. curema</i> Venezuela II	0,003	0,002
<i>M. curema</i> Brasil III	0,002	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,001	0,001
<i>M. hospes</i>	0,002	0,002

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>M. cephalus</i>		0,025	0,026	0,028	0,025	0,025	0,027	0,026	0,028
2. <i>M. liza</i>	0,237		0,019	0,021	0,019	0,020	0,022	0,020	0,022
3. <i>M. trichodon</i>	0,254	0,162		0,022	0,022	0,023	0,022	0,021	0,021
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,286	0,190	0,202		0,016	0,016	0,022	0,021	0,023
5. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,254	0,169	0,209	0,138		0,007	0,023	0,019	0,021
6. <i>M. curema</i> Brasil III	0,262	0,189	0,226	0,130	0,033		0,023	0,020	0,022
7. <i>M. sp</i>	0,279	0,188	0,213	0,218	0,214	0,216		0,019	0,013
8. <i>M. rubrioculus</i>	0,271	0,173	0,199	0,193	0,176	0,192	0,163		0,019
9. <i>M. hospes</i>	0,297	0,203	0,203	0,219	0,210	0,222	0,097	0,162	

5. Gene ATPase 8

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0,002	0,002
<i>M. trichodon</i>	0,193	0,047
<i>M. curema</i>	0,057	0,015
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M. hospes</i>	0,006	0,006

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>M. cephalus</i>		0,066	0,056	0,060	0,069	0,060	0,071
2. <i>M. liza</i>	0,316		0,029	0,044	0,054	0,045	0,060
3. <i>M. trichodon</i>	0,311	0,134		0,024	0,047	0,035	0,050
4. <i>M. curema</i>	0,313	0,202	0,122		0,045	0,035	0,047
5. <i>M. sp</i>	0,364	0,261	0,246	0,211		0,043	0,027
6. <i>M. rubrioculus</i>	0,297	0,186	0,178	0,149	0,176		0,041
7. <i>M. hospes</i>	0,376	0,290	0,268	0,227	0,076	0,168	

Distancia intraespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0	0
<i>M. liza</i>	0,002	0,002
<i>M. trichodon</i>	0,193	0,050
<i>M. curema</i> Brasil I	0,009	0,005
<i>M. curema</i> Venezuela II	0,010	0,007
<i>M. curema</i> Brasil III	0	0
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M. hospes</i>	0,006	0,006

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>M. cephalus</i>		0,070	0,060	0,058	0,069	0,071	0,073	0,063	0,075
2. <i>M. liza</i>	0,316		0,031	0,062	0,047	0,046	0,058	0,046	0,065
3. <i>M. trichodon</i>	0,311	0,134		0,038	0,025	0,023	0,048	0,037	0,052
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,277	0,265	0,176		0,036	0,032	0,058	0,040	0,059
5. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,325	0,182	0,107	0,131		0,011	0,046	0,039	0,048
6. <i>M. curema</i> Brasil III	0,331	0,172	0,094	0,109	0,017		0,042	0,038	0,046
7. <i>M. SP</i>	0,364	0,261	0,246	0,271	0,200	0,176		0,043	0,026
8. <i>M. rubrioculus</i>	0,297	0,186	0,178	0,156	0,152	0,143	0,176		0,041
9. <i>M. hospes</i>	0,376	0,290	0,268	0,275	0,211	0,204	0,076	0,168	

6. GENE COI

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,002	0,001
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0,002	0,001
<i>M. curema</i>	0,047	0,005
<i>M. incilis</i>	0,001	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,004	0,001
<i>M. hospes</i>	0,010	0,003

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M. cephalus</i>		0,021	0,020	0,019	0,021	0,021	0,020	0,019
2. <i>M. liza</i>	0,218		0,019	0,017	0,019	0,021	0,019	0,019
3. <i>M. trichodon</i>	0,197	0,194		0,017	0,019	0,018	0,019	0,020
4. <i>M. curema</i>	0,202	0,180	0,186		0,006	0,018	0,017	0,018
5. <i>M. incilis</i>	0,196	0,189	0,190	0,051		0,020	0,019	0,020

Anexo II

6. <i>M. sp</i>	0,217	0,211	0,177	0,185	0,182		0,015	0,011
7. <i>M. rubrioculus</i>	0,213	0,186	0,191	0,184	0,188	0,129		0,014
8. <i>M. hospes</i>	0,195	0,195	0,204	0,196	0,198	0,079	0,107	

Distancia intraespecífica incluindo as três linhagens de *M. curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,002	0,001
<i>M. liza</i>	0	0
<i>M. trichodon</i>	0,002	0,001
<i>M. curema</i> Brasil I	0,006	0,002
<i>M. incilis</i>	0,001	0,001
<i>M. curema</i> venezuela II	0,029	0,004
<i>M. curema</i> Brasil III	0,005	0,001
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0,004	0,001
<i>M. hospes</i>	0,010	0,003

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *M. curema*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>M. cephalus</i>		0,021	0,020	0,020	0,020	0,019	0,019	0,021	0,020	0,018
2. <i>M. liza</i>	0,218		0,019	0,020	0,020	0,018	0,018	0,021	0,019	0,019
3. <i>M. trichodon</i>	0,197	0,194		0,019	0,020	0,018	0,019	0,017	0,019	0,019
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,195	0,188	0,186		0,003	0,009	0,009	0,019	0,020	0,020
5. <i>M. incilis</i>	0,196	0,189	0,190	0,008		0,010	0,009	0,019	0,019	0,020
6. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,209	0,180	0,187	0,077	0,080		0,007	0,019	0,018	0,019
7. <i>M. curema</i> Brasil III	0,203	0,173	0,186	0,068	0,066	0,048		0,019	0,019	0,018
8. <i>M. sp</i>	0,217	0,211	0,177	0,181	0,182	0,186	0,188		0,016	0,011
9. <i>M. rubrioculus</i>	0,213	0,186	0,191	0,192	0,188	0,178	0,181	0,129		0,014
10. <i>M. hospes</i>	0,195	0,195	0,204	0,203	0,198	0,199	0,188	0,079	0,107	

7. GENE CYTB

Distancia intraespecífica

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,006	0,002
<i>M. liza</i>	0,004	0,001
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i>	0,067	0,006
<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M.hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica

Espécie	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>M. cephalus</i>		0,022	0,018	0,016	0,020	0,020	0,019
2. <i>M. liza</i>	0,292		0,018	0,015	0,019	0,017	0,018
3. <i>M. trichodon</i>	0,250	0,211		0,013	0,016	0,016	0,017
4. <i>M. curema</i>	0,259	0,193	0,176		0,015	0,015	0,015
5. <i>M. sp</i>	0,296	0,245	0,200	0,213		0,012	0,011
6. <i>M. rubrioculus</i>	0,271	0,208	0,191	0,182	0,127		0,005
7. <i>M. hospes</i>	0,273	0,232	0,197	0,181	0,113	0,021	

Distancia intra-específica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

	d	S.E.
<i>M. cephalus</i>	0,006	0,002
<i>M. liza</i>	0,004	0,001
<i>M. trichodon</i>	0	0
<i>M. curema</i> Brasil I	0,005	0,001
<i>M. curema</i> Venezuela II	0,006	0,001
<i>M. curema</i> Brasil III	0,003	0,001

<i>M. sp</i>	n/c	n/c
<i>M. rubrioculus</i>	0	0
<i>M. hospes</i>	0	0

Distancia interespecífica incluindo as três linhagens de *Mugil curema*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>M. cephalus</i>		0,021	0,018	0,018	0,018	0,018	0,020	0,020	0,020
2. <i>M. liza</i>	0,292		0,018	0,015	0,015	0,017	0,019	0,017	0,018
3. <i>M. trichodon</i>	0,250	0,211		0,016	0,014	0,015	0,016	0,016	0,017
4. <i>M. curema</i> Brasil I	0,262	0,188	0,195		0,011	0,011	0,017	0,015	0,016
5. <i>M. curema</i> Venezuela II	0,260	0,192	0,160	0,104		0,009	0,017	0,016	0,015
6. <i>M. curema</i> Brasil III	0,256	0,198	0,169	0,105	0,077		0,017	0,017	0,016
7. <i>M. sp</i>	0,296	0,245	0,200	0,216	0,205	0,215		0,012	0,011
8. <i>M. rubrioculus</i>	0,271	0,208	0,191	0,180	0,176	0,186	0,127		0,005
9. <i>M. hospes</i>	0,273	0,232	0,197	0,180	0,176	0,186	0,113	0,021	