

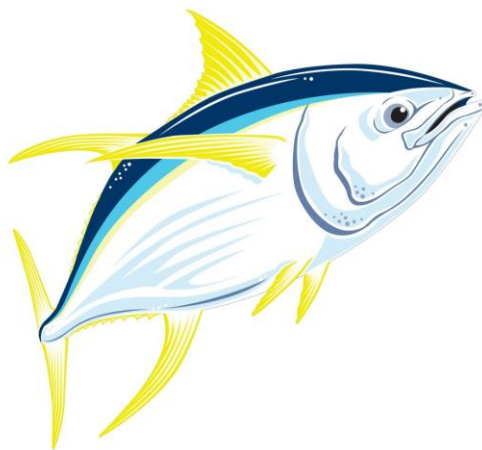
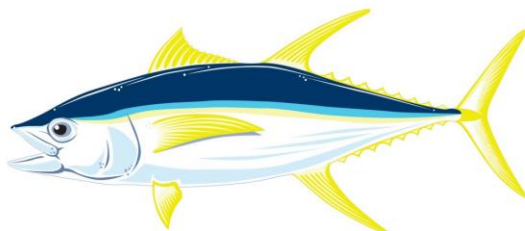


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
UNESP-BOTUCATU**



TESES DE DOUTORADO

**Análise da composição e distribuição geográfica dos
atuns da costa brasileira (Perciformes: Scombridae:
Thunnini)**



Me. Zoila Raquel Siccha Ramirez

Botucatu

Fevereiro/ 2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
UNESP-BOTUCATU**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)**

TESES DE DOUTORADO

**Análise da composição e distribuição geográfica dos
atuns da costa brasileira (Perciformes: Scombridae:
Thunnini)**

Teses apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Genética) como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Genética

Aluna: Me. Zoila Raquel Siccha Ramirez

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

**Botucatu
Fevereiro/2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ramirez, Zoila Raquel Siccha.

Análise da composição e distribuição geográfica dos
atuns da costa brasileira (Perciformes: Scombridae:
Thunnini) / Zoila Raquel Siccha Ramirez. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Claudio Oliveira

Capes: 20204000

1. Atum (Peixe) - identificação. 2. Atum (Peixe) -
Distribuição geográfica. 3. DNA. 4. Pesca - Legislação.

Palavras-chave: Atuns; D-loop; DNA barcode; Scombridae;
Tuna.

*"Quando morrer voltarei para buscar os instantes que não vivi junto
do mar"*

Sophia de Mello Breyner

Agradecimentos

Agradeço a Deus ante todo por dar-me cada dia o maravilhoso dom da vida.

Agradeço a minha mãe Zoila e meu pai Pablo por ser as colunas que me tem sustentado sempre, porque deles tenho meu passado, meu presente e meu futuro, pela força incrível e a luta constante de todos os dias. Por ajudar-me a vencer os medos e dar-me ânimos e sobre todo por acreditar em mim e sentir-se sempre orgulhosos, mesmo que muitas vezes não mereça. Os amo muito pais.

A Ricardo Britzke, por ser meu braço direito e esquerdo, amigo, companheiro e família em este Brasil tão grande. Por dar-me todo seu amor e fazer que me sinta em casa. Obrigada Ri.

A meus irmãos, sobrinhos, tios e primos por sentir-se orgulhosos de mim, pela preocupação e pelo enorme carinho que sempre tem me mostrado. Obrigada por isso e muito mais.

A meus companheiros de casa, Luciana, Vivi e Carlinhos por compartilhar comigo seus dias e formar parte de minha família brasileira.

Ao professor Fausto Foresti e todos os amigos do laboratório de Biologia e Genética experimental pelo seu companheirismo, amizade, estima, colaboração e por todos os churrascos.

Às diferentes pessoas e instituições como o Blgo. Nicolás Ehemann, Dr. Mauro Nirchio, Dr. Jonathan Ready, Dr. Fabio Hazin, Dr. Paulo de Oliveira, Msc. Sunny Pacheco, Eng. Geraldine Coelho, Eng. Andreia Caravaggio, Eng. Solange Medeiros e IMARPE pela sua colaboração na doação de amostras, vocês foram a peça chave, sem vocês esta teses não teria sido possível.

À FAPESP por acreditar no projeto e em mim, pelo respaldo econômico em estes quatro anos de doutorado. Muito obrigada.

Finalmente um agradecimento especial para meu orientador o Dr. Claudio Oliveira, pela sua confiança, ajuda, compreensão e ensinamentos em todo momento, por dar-me a oportunidade de formar parte de seu laboratório. Por ajudar-me a alcançar vários de meus objetivos profissionais e de vida. Obrigada eternamente por estes seis anos pelo Brasil e por muitos outros lugares que definitivamente serão inesquecíveis.

Agradecimientos

Agradezco a Dios ante todo por darme cada día el maravilloso don de la vida.

Agradezco a mi mamá Zoila y mi papá Pablo por ser las columnas que me han sustentado siempre, porque de ellos tengo mi pasado, mi presente y mi futuro, por la fuerza increíble y la lucha constante de todos los días. Por ayudarme a vencer los miedos y darme ánimos y sobre todo por creer en mí y sentirse orgullosos siempre, aunque muchas veces no lo merezca. Los amo.

A Ricardo Britzke por ser mi brazo derecho e izquierdo, amigo, compañero y familia en este Brasil tan grande. Por darme todo su amor y hacerme sentir que estoy en casa. Gracias Ri!

A mis hermanos, sobrinos, tíos y primos por sentirse orgullosos de mí, por la preocupación y por el gran cariño que siempre me han demostrado. Gracias por eso y mucho más.

A mis compañeros de casa Luciana, Viví y Carlitos por compartir conmigo sus días y formar parte de mi familia brasilera.

Al profesor Fausto Foresti y todos mis amigos del Laboratorio de Biología Experimental y Genética por su compañerismo, amistad, estima, colaboración, y por los churrascos.

A las diferentes personas y entidades como el Blgo. Nicolás Ehemann, Dr. Mauro Nirchio, Dr. Jonathan Ready, Dr. Fabio Hazin, Dr. Paulo de Oliveira, Msc. Sunny Pacheco, Ing. Andreia Caravaggio, Ing. Solange Medeiros, Ing. Geraldine Coelho e IMARPE por su colaboración en la donación de muestras ustedes fueron la pieza clave sin ustedes esta tesis no hubiera sido posible.

A FAPESP por creer en este proyecto y en mí. Por todo el respaldo económico en estos cuatro años. Gracias FAPESP.

Finalmente un agradecimiento especial para mi orientador Dr. Claudio Oliveira, por su confianza, ayuda, comprensión y enseñanzas en todo momento, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Por ayudarme a alcanzar varios de mis objetivos profesionales y de vida. Gracias eternamente por estos seis años por el Brasil y muchos otros lugares que definitivamente serán inolvidables.

Resumo

Os atuns, bonitos e cavalas são peixes marinhos pelágicos distribuídos em todos os oceanos tropicais e subtropicais do mundo. São frequentemente capturados e comercializados ao longo de toda sua área de distribuição sendo as oito espécies do gênero *Thunnus* as de maior valor comercial. A correta identificação das espécies, assim como a delimitação de suas populações são de muita importância na pesca, permitindo a tomada de melhores decisões sobre políticas pesqueiras e conservação. Os resultados são discutidos em dois capítulos, o primeiro baseado na identificação das espécies dentro da família Scombridae e o segundo testando análises populacionais em duas espécies de atuns *Thunnus obesus* e *Katsuwonus pelamis*, frequentemente capturados no Brasil e Peru. Para isto testamos a eficiência da metodologia do DNA barcode e a amplificação da região controle na identificação das espécies pertencentes à família Scombridae, com ênfases no gênero *Thunnus*, e a identificação e separação das populações dos dois atuns. Vinte espécies foram analisadas com o COI (648 espécimes) e dezoito com o D-loop (313 espécimes). Para a primeira parte do estudo, o gene COI discriminou 66% das espécies analisadas, mas as pertencentes ao gênero *Thunnus* não puderam ser separadas, diferente dos resultados encontrados no D-loop onde todas as espécies foram adequadamente separadas, sendo uma ferramenta eficiente para a identificação das espécies da família Scombridae, incluindo o gênero *Thunnus*. Nas análises populacionais (segundo capítulo) com o uso do D-loop foi possível identificar duas populações de *T. obesus* (Pacífico e Atlântico), com um valor alto de F_{st} , fortemente estruturado e estatisticamente significativo e também de duas populações de *Katsuwonus pelamis* (clado I e clado II) mas nesse segundo caso não foi verificada um isolamento geográfico das populações.

Abstract

Tunas, bonitos and mackerels are marine pelagic fishes distributed in the tropical and subtropical oceans of the world. They are highly captured and traded throughout their distribution area being the eight species of the genus *Thunnus* those with higher commercial value. Correct species identification in fisheries is needed to take better conservation measures and efficient fisheries management. The results are discussed in two chapters, the first based on the identification of the species within the family Scombridae and the second testing population analysis in two species of tuna *Katsuwonus pelamis* and *Thunnus obesus*, often captured in Brazil and Peru. For this, test the efficiency of the DNA barcode methodology and amplification of the control region of species of the Scombridae family, with emphasis in the genus *Thunnus*, and the identification and separation of the populations of two tuna. Twenty species were analyzed with the COI (648 specimens) and eighteen with the D-loop (313 specimens). For the first part of the study, the COI gene discriminated 66% of the analyzed species, but those belonging to the genus *Thunnus* could not be separated, unlike the results found in the D-loop in which all species were properly separated and powerful tool for species identification of the Scombridae family, including genus *Thunnus*. In the population analysis (second chapter) using the D-loop was possible to identify two populations of *T. obesus* (Pacific and Atlantic), with a high value of *Fst*, highly structured and statistically significant and also of two populations of *K.pelamis* (clade I and clade II), but in this second case has not been verified a geographical isolation of populations.

Sumario

Introdução.....	1
Capítulo I - DNA barcode of tunas and allied species (Teleostei: Scombridae) in South America: effectiveness and limitations.....	24
Capítulo II - Analises filogeográficos e estrutura genética populacional do atum patudo, <i>Thunnus obesus</i> , e do bonito listrado, <i>Katsuwonus pelamis</i> (Scombridae: Thunnini) na costa brasileira e peruana.....	47
Referências.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Informação geral dos tunídeos

Dois terços do nosso planeta são cobertos por água e grande parte desse ambiente fornece suporte para a vida dos peixes, que correspondem à cerca de 50% dos vertebrados (Nelson, 2006). Os peixes apresentam uma grande capacidade de adaptação biológica a diferentes condições ambientais. Neste processo podemos observar as mais diversas especializações de morfologia, fisiologia e comportamento (Purdom, 1993).

Os peixes, como alimento, constituem uma das principais fontes de proteínas de alta qualidade que o homem necessita para sua alimentação. Não só proporcionando uma ampla variedade de produtos alimentícios para consumo humano, mas também sendo empregados na produção animal, para a obtenção de produtos de valor medicinal e de outros produtos (Fernandez *et al.*, 1991).

A pesca e a aquicultura constituem um dos segmentos agropecuários mais importantes a nível mundial, tendo em vista que o comércio internacional de pescado movimenta mais de 70 bilhões de dólares por ano. Também é considerada uma das atividades econômicas mais promissoras, por causa da tendência das pessoas substituírem o consumo de carnes vermelhas pelos produtos pesqueiros. O consumo *per capita* de pescado no mundo tem aumentado de 9,9 kg na década dos 60 até 19,2 kg no ano 2012 (Food and Agriculture Organization - FAO, 2014), porém, estima-se que alcance um valor médio de 22,5 kg até 2030, o que vai gerar uma demanda adicional de 100 milhões de toneladas de pescado (FAO, 2009). A pesca e a aquicultura é uma fonte não só de saúde, mas também de riqueza, a quantidade de empregos vinculados a esta área tem crescido rapidamente gerando decenas de milhões de empregos que beneficia direta e indiretamente a mais de centos de milhões de pessoas (FAO, 2014). No ano 2011 consumiu-se 131 milhões de toneladas de pescado no mundo inteiro, com um incremento da produção de pescado de 3,2% anualmente superando por enquanto ao 1,7% do crescimento da população mundial (FAO, 2012).

Dentro dos peixes capturados para o consumo fresco e processados destacam-se as espécies pertencentes à tribo Thunnini, muitos deles denominados “atuns”. Os atuns constituem um importante recurso pesqueiro mundial sendo um dos grupos mais representativos dentro da indústria alimentícia, na produção de enlatados de peixes (Joseph, 2003). A FAO (2014) registrou uma captura total de atuns e afins de sete milhões de toneladas, convertindo-se num novo recorde de captura. As principais espécies oferecidas no mercado são o bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*), o atum de nadadeira amarela (*Thunnus albacares*), o bigeye (*T. obesus*), o albacora (*T. alalunga*), o atum azul do norte (*T. thynnus*) e o atum azul do sul (*T. maccoyii*) (Pillai e Satheeshkumar, 2012).

Os atuns são peixes de grande valor econômico como, por exemplo, o atum de nadadeira azul, que na metade dos anos 1970 custava em torno de 10.000 até 35.000 dólares a unidade. Em janeiro de 2001 um espécime destes custava em média 175.000 dólares em Tóquio, Japão (Block *et al.*, 2001). No ano de 2014, um atum nadadeira azul de 230 kilos foi leilado no Japão por 166 mil reais.

1.2 Biologia dos atuns

Os atuns são peixes teleósteos de grande voracidade (Collette, 1995) sendo considerados "nômades do mar" pelas grandes migrações anuais e pela ampla distribuição por quase todos os mares e oceanos; em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas do mundo (Lassen, 1989), razão pela qual os cardumes podem ser explorados em vários países distribuídos pelos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico (Hazin, 2007). Graças a esta característica de migrar por quase todo o planeta, os atuns se encontram entre os alimentos de maior consumo, pesca e elaboração de produtos relacionados, a nível mundial (Lassen, 1989), sendo também bastante apreciados pelos consumidores quando servidos como “sashimi” (Ruiz-Capillas e Moral, 2005).

Estes peixes formam grandes cardumes, por causa da alta taxa de reprodução e de crescimento, tanto em comprimento quanto em peso (Collete, 1995). Costumam realizar amplos movimentos horizontais e verticais, na busca por temperaturas que variam de 18 a 31°C. São peixes oportunistas, alimentando-se de peixes, cefalópodos e crustáceos (Bertrand *et al.*, 2002). Possuem um sistema circulatório peculiar, pois conseguem realizar uma eficiente troca de calor com o meio, a ponto de conseguir elevar a temperatura corporal acima daquela registrada na água (Bril *et al.*, 2005).

Os tunídeos têm o corpo fusiforme e robusto. O dorso de cor azul escuro, muitas vezes com desenhos, a parte lateral e o ventre prateado podendo apresentar ondas, pontos e linhas escuras. Apresentam duas nadadeiras dorsais, uma nadadeira anal, um par de nadadeiras peitorais, um par de nadadeiras ventrais e uma nadadeira caudal em forma semilunar. Também contam com uma serie dorsal e outra ventral de pínulas (pequenas nadadeiras) (Belmonte *et al.*, 2007).

1.3 Explorações pesqueiras do atum

As escavações arqueológicas mostram que a pesca de atuns são registradas desde pelo menos o sétimo milênio A.C. no mar Mediterrâneo (Desse e Desse-Berset, 1994). Em torno de 100 áreas pesqueiras onde eram perseguidos tunídeos, bonitos e sardinhas foram estabelecidas pelos fenícios, e mais tarde pelos romanos em torno do mar Mediterrâneo ocidental (Farrugio 1981; Mather *et al.*, 1995; Doumenge, 1998).

Na atualidade, os atuns são capturados por barcos atuneiros em aproximadamente 70 países costeiros e ilhas do mundo. Países como Japão e Estados Unidos são responsáveis por mais de 50% de todas as capturas realizadas no mundo (Joseph *et al.*, 1994).

A produção mundial da pesca dos tunídeos vem aumentando com os anos de 0,6 milhões de toneladas na década de 1950 até mais de sete milhões nos dias de hoje (FAO, 2014). No oceano Atlântico, atualmente, são capturados cerca de 600 mil toneladas de atuns

por ano, correspondendo a um valor da ordem de US\$ 4 bilhões. A participação brasileira nesse total tem uma produção próxima a 40 mil toneladas, o que representa cerca de 7% do total capturado (Hazin *et al.*, 2009).

No sudeste e sul do Brasil são capturadas especialmente as espécies *Thunnus albacares* (albacora de laje), *T. alalunga* (albacora branca) e *T. obesus* (albacora bandolin) (Santos *et al.*, 2010) e as espécies de menor valor comercial, como os *Euthynnus* spp. (bacoretas e barrilete negro) ou o atum de nadadeira negra (*T. atlanticus*) (Belmonte *et al.*, 2007).

Os recursos pesqueiros oceânicos apresentam uma série de vantagens comparativas, em relação aos recursos costeiros, entre os quais se podem destacar:

- Grande proximidade das principais áreas de pesca, no caso do Brasil.
- Algumas espécies capturadas, como as albacoras (*Thunnus albacares*), apresentam alto valor comercial para a exportação, constituindo-se em importante fonte de renda para o país.
- Outras espécies, também presentes nas capturas, como os tubarões, embora apresentem preço relativamente baixo, possuem excelente valor nutritivo, representando importante fonte de proteína para a população de baixa renda.
- Ampla distribuição.
- Elevado peso individual (exemplares de algumas espécies, como o espadarte, chegam a pesar mais de 400 kg).
- Biomassa elevada.

A realidade é que os peixes são uma fonte importante de alimento para muitos países, e poderiam sê-lo por muito tempo. Segundo a FAO (2007), “a rápida extensão da aquicultura e a sobre exploração de muitas indústrias pesqueiras têm criado condições onde o uso irresponsável dos recursos naturais pode resultar em impactos ambientais e sociais adversos, conflitos entre setores e uma não sustentabilidade dos recursos (Oliveira *et al.*, 2009).

Por tal motivo no caso dos atuns e outras espécies altamente migratórias foi preciso estabelecer medidas de ordenação e conservação que permitam a todos os países aproveitar dos mesmos recursos sem sobre-explorar as populações (Ramírez-López e Estrada, 2008), sendo criadas algumas instituições encarregadas de proteger estes recursos. Para o oceano Atlântico existe a Comissão Internacional para a conservação do Atum Atlântico (ICCAT) criada em 14 de maio de 1966 no Rio de Janeiro e que entrou em vigência em 1968. O Brasil e mais 45 países foram signatários dessa comissão e são responsáveis pela coleta, análise e apresentação dos dados referentes às capturas e esforço de pesca de sua área de atuação, determinando as condições do estoque, objetivando conservar as espécies para as futuras gerações (Hazin e Travassos, 2007).

1.4 Informações da família Scombridae

Scombridae é uma família de peixes marinhos epipelágicos, composta por 15 gêneros e 51 espécies (Eschemeyer, 2014), apresentando duas subfamílias, Gasterochismatinae que possui somente a espécie *Gasterochisma melampus* e Scombrinae que se divide atualmente em quatro tribos, Scombrini, Scomberomorini, Sardini e Thunnini, sendo estas muito importantes dentro da indústria alimentícia, mais especificamente relacionada com a elaboração dos produtos enlatados (Belmonte *et al.*, 2007).

Os atuns pertencem à tribo Thunnini que compreende 14 espécies e quatro gêneros: *Thunnus*, *Euthynnus*, *Katsuwonus* e *Auxis*. As espécies de maior valor comercial pertencem ao gênero *Thunnus*, que é formado por oito espécies distribuídas por todo o mundo. Nos últimos anos também se tem adicionado o gênero *Allothunnus* que possui somente a espécie *Allothunnus fallai* Serventy, 1948 (Belmonte *et al.*, 2007). São espécies de distribuição mundial, sendo que são encontradas na costa brasileira 11 espécies da tribo Thunnini (*Katsuwonus pelamis*, *Euthynnus alletteratus*, *Euthynnus affinis*, *Auxis rochei rochei*, *Auxis thazard thazard*, *Allothunnus fallai*, *Thunnus obesus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus maccoyii*,

Thunnus thynnus, *Thunnus albacares* e *Thunnus atlanticus*) (Eschemeyer, 2014).

Ainda dentro da tribo Thunnini destacam-se a albacora bandolim (*Thunnus obesus*), a albacora laje (*Thunnus albacares*), o bonito de barriga listrada (*Katsuwonus pelamis*), a albacora branca (*Thunnus alalunga*) e a albacora azul (*Thunnus thynnus*). Sendo que somente essas cinco espécies representam cerca de 80% das capturas mundiais dos tunídeos (Bril *et al.*, 2005).

Outras espécies de Scombrídeos são também bastante capturados e comercializados servindo como alimento ou para fins recreativos. Dentro os mais conhecidos estão os bonitos, as cavalas e as serras, estas são de caráter mais nerítico e vivem nas plataformas, próximo de ilhas e arquipélagos e não migram pelos oceanos (Belmonte *et al.*, 2007) sendo muitas vezes capturados e comercializados como atuns verdadeiros, estas espécies pertencem a tribo Scomberomorini, Scombrini e Sardini. A tribo Sardini apresenta oito espécies distribuídas em quatro gêneros, sendo *Sarda sarda* a única espécie que ocorre no Brasil (Eschemeyer, 2014). A tribo Scombrini esta constituída por dois gêneros *Scomber* e *Rastrelliger* com dois e três espécies, respectivamente, e a tribo Scomberomorini apresenta três gêneros sendo o gênero *Scomberomorus* o que apresenta a maior quantidade de espécies (18), *Acanthocybium* (1) e *Grammatorcynus* (2) (Eschemeyer, 2014). No Brasil ocorrem três espécies do gênero *Scomberomorus* sendo a *S. brasiliensis* e a *S. cavalla* as espécies de maior importância comercial, não unicamente no Brasil, mas também em outros países onde esta espécie ocorre como na Trinidad e Tobago e na Venezuela (Hodgkinson-Clarke, 1990; Gold *et al.*, 2010). *Scomberomorus brasiliensis* encontra-se nas regiões mais costeiras, comuns em costões, ilhas e praias abertas. Possui vasta distribuição geográfica, se estende desde o Caribe e costa atlântica das Américas Central e do Sul, entre os limites de 20° N até 30° S, podendo ser encontrado desde Belize até o Rio Grande do Sul, no Brasil (Carvalho-Filho, 1999). Habita a zona epipelágica sendo considerada uma espécie nerítica (Fonteles-Filho, 1989). No nordeste

do Brasil, *S. brasiliensis* representa uma importante parte da atividade pesqueira (Fonteles-Filho, 1988), sobretudo no estado de Maranhão.

1.5 Estrutura e variabilidade populacional

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). Quando os membros de uma população de peixes são segregados em vários estoques reprodutivos, a frequência dos alelos, identificada com auxílio de marcadores genéticos, sofre uma flutuação genética. A variação na frequência dos genes reflete a magnitude do isolamento reprodutivo entre esses estoques. Assim, a diferença na frequência dos genes entre amostras geográficas pode ser usada para estimar indiretamente padrões de fluxo gênico e, portanto, a estrutura genética do estoque (Heist, 2005).

A conservação da variabilidade genética é um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo de extinção (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, 1995; Levy e Cassano, 1994). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes pode estimular a sobre-exploração, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e eliminar estoques locais (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 se pode 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.

Conforme Camhi et al. (1998) na exploração pesqueira é freqüente 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 espécies possuem características biológicas diferentes como, fecundidade, taxa de crescimento, tamanho de maturidade e outras características populacionais importantes (Lessa, 1986). A informação sobre a estrutura de um stock que se encontra baixo uma pressão intensa de pesca é requerida para um efetivo manejo e sustentabilidade do limite de captura da espécie. Conhecer a estrutura exata de uma população é fundamental na gestão de pesca, já que populações diferentes podem possuir novas características genéticas, fisiológicas, comportamentais que podem ter um efeito sobre as características do ciclo de vida (Stepien, 1995). Por todo o mencionado existe uma necessidade urgente do uso de ferramentas genéticas para identificar a estrutura das populações para permitir uma gestão eficaz dos estoques (Waples *et al.*, 2008). Resultados errôneos podem ser produzidos, se considerarmos diversas populações isoladas ou espécies distintas como uma única população.

1.6 Marcadores mitocondriais

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 stock 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 seqüências 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.

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; Perdices *et al.*, 2004; Cortey *et al.*, 2004; Perdices *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007; Dodson *et al.*, 2007; Zemlak *et al.*, 2008). 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) e em animais marinhos se têm utilizado os padrões de diferenciação genética também na determinação de regiões de berçários e na caracterização de filopatria em diversas espécies, inclusive entre tubarões (Palumbi e Baker, 1994; Pardini *et al.*, 2001; Feldheim *et al.*, 2002; Schrey e Heist, 2003).

Entre os marcadores genéticos, principalmente usados na atualidade temos os microssatélites e o DNA mitocondrial (mtDNA) que têm sido amplamente empregados no estudo de populações de peixes com inferência sobre relações filogenéticas, estudo de padrões de migração, identificação genética de espécies, filogeografia, estrutura da população, conservação e manejo de espécies, diferenciação de estoques cultivados, evidências de introgressão genética, sistemas reprodutivos e efeitos de fragmentação de ambientes entre taxa relacionados (Heist e Gold, 1999; Farias *et al.*, 2001; Hoarau *et al.*, 2002; Koskinen *et al.*, 2002; Triantafyllidis *et al.*, 2002a; Triantafyllidis *et al.*, 2002b; Dunn, McEachran e Honneycut, 2003; Hsieh *et al.*, 2005; Keeney *et al.*, 2005; Laikre *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2006; Keeney e Heist, 2006; Mães *et al.*, 2006; Dosay-Akbulut, 2008).

Haplótipos de mtDNA vem sendo, nos últimos anos, utilizados intensamente nas pesquisas em genética de peixes para a resolução de problemas populacionais (Patarnello *et al.*, 2003; Falk *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Strecker *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Mendonça *et al.*, 2009; Cardoso e Montoya-Burgos, 2009), em Scombrideos (Martinez e Zardoya, 2005; Theisen *et al.*, 2008; Dammannagoda *et al.*, 2008; Chiang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Saxton, 2009; Aires-Da-Silva e Maunder, 2011; Menezes *et al.*, 2012; Kunal *et al.*, 2013). O mtDNA é uma molécula simples encontrada em todas as células (Attardi, 1995). Algumas espécies exibem mais de uma forma de mtDNA, condição conhecida como heteroplasmia e presente também em peixes marinhos como os Chondrichthyes (Brown *et al.*, 1992; Ludwig *et al.*, 2000; Grunwald *et al.*, 2002).

O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados e até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). A região controle (alça-D ou *D-loop*), região não codificadora do genoma mitocondrial, encontra-se localizada entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores, o tRNA da prolina e o tRNA da fenilalanina e, devido ao grande número de

sucessivas repetições, o comprimento deste fragmento varia consideravelmente entre os peixes (Meyer, 1993).

A região controle possui uma maior taxa de substituição de bases em relação às outras regiões do mtDNA e do DNA nuclear (Meyer, 1993). Provavelmente devido à sua alta taxa de evolução, que é de duas a cinco vezes maior de que os genes mitocondriais codificadores de proteínas, e por não codificar nenhuma proteína ou outro produto funcional, a região controle varia bastante em comprimento, sendo a principal responsável pela variação do comprimento do genoma mitocondrial dos vertebrados.

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), o genoma mitocondrial é muito mais eficiente do que os marcadores nucleares devido à diferença do tamanho efetivo da população nestes dois genomas (Machida e Tsuda, 2010).

1.7 Identificação molecular de espécie

Muitos conceitos de espécie foram propostos ao longo da história, incluindo o tipológico, morfológico, biológico, por isolamento reprodutivo, filogenético, etc. Ainda que extensos debates sejam constantemente travados em relação aos diferentes conceitos de espécie (De Queiroz, 2005; Waugh, 2007), do ponto de vista prático, os taxonomistas são os profissionais responsáveis pela caracterização dessas entidades biológicas e sua classificação, tornando-as palpáveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome, erigido de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (Köhler et al., 2007).

Essa atribuição de um nome não constitui uma simples aplicação de regras de nomenclatura, mas sim na elaboração de uma hipótese, segundo a qual um determinado conjunto de caracteres (usualmente morfológicos) é capaz de identificar uma entidade (espécie) com características biológicas próprias e histórias evolutivas independentes de outras entidades biológicas similares. Essas hipóteses podem ser testadas de diversas maneiras e, como todas as hipóteses, podem ser refutadas ou não. Adicionalmente, quando as descrições de espécies são baseadas em uma ampla base de dados, elas se tornam hipóteses científicas interessantes, permitindo a elaboração de predições explícitas sobre os atributos dos organismos (Lipscomb *et al.*, 2003).

Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies simplesmente pelo fato de que foram os primeiros disponíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o desenvolvimento de novos métodos de estudos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade. Há aproximadamente 30 anos, a análise de sequências de genes de DNA ribossômico foi utilizada para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (Woese e Fox, 1977) e as pesquisas em mtDNA dominaram a sistemática molecular no final da década de 70 e início da década de 80 (Avise, 1994) e hoje constituem um dos principais sustentadores desse tipo de investigação, com várias revistas dedicadas exclusivamente a esse campo como: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *Molecular Biology and Evolution* e *Journal of Molecular Evolution*. Entre os dados moleculares utilizados em Taxonomia e Sistemática temos as análises citogenéticas, bioquímicas, as isozimas, dados imunológicos e, mais recentemente, as sequências de nucleotídeos (Hillis *et al.*, 1996).

Muitas das espécies de tunídeos são chamadas por nomes errados pela má identificação das espécies, por exemplo, as espécies *Euthynnus pelamis*, *Euthynnus affinis*, *Auxis rochei*, *Auxis thazard* e *Sarda orientalis*, são popularmente chamadas nos países que se

encontram na costa do Oceano Pacífico, como “bonitos” e são comercializados como filé no mercado sendo quase impossível o reconhecimento da espécie (Wen-Feng *et al.*, 2008). A diferença do que acontece nos países da costa do Oceano Atlântico que algumas destas espécies são chamadas de “atuns”, mas empregando marcadores moleculares seria possível identificar essas espécies de tunídeos (Wen-Feng *et al.*, 2008).

Recentemente foi proposto que um curto segmento de cerca de 650 nucleotídeos da extremidade 5’ do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) seria suficiente, em muitos metazoários, para identificá-los a nível de espécie (Hebert *et al.*, 2003a, 2003b). O uso dessa metodologia, denominada *DNA barcode*, ganhou muita relevância com a criação em 2004 do *Consortium for the BarCode of Life* (CBOL) cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene COI, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automatização da identificação das espécies (ver o sítio www.barcoding.si.edu para maiores detalhes). Como pode ser observado na literatura, outros segmentos gênicos também têm sido sugeridos para esse mesmo fim, como os genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (Vences *et al.*, 2005) ou outros genes (Lahaye *et al.*, 2008), porém, por questões de padronização e pelo seu aparente melhor desempenho, o CBOL adotou como sequência padrão o fragmento citado do gene COI.

Essencialmente, o que os usuários da metodologia de *DNA barcode* pretendem é tornar possível a atribuição de indivíduos a espécies e facilitar a descoberta e identificação de novas espécies (Moritz e Cicero, 2004).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares aplicados à identificação de espécies tem se mostrado de grande importância, sobretudo para a quantificação da exploração de populações naturais, avaliação e fiscalização do comércio de espécies sob proteção governamental e ainda para a certificação de produtos processados, agregando valor à sua comercialização. Trabalhos que visam à identificação genética de produtos oriundos da pesca estão sendo mais frequentes na literatura, com alguns deles direcionados especificamente ao

grupo dos tubarões (Sebastian *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2006; Shivji *et al.*, 2002).

Mesmo com os avanços nas ferramentas moleculares, muitas vezes torna-se complicado a identificação de algumas espécies a nível molecular. Acredita-se que a hibridação natural é mais comum nos peixes do que em qualquer outro grupo de vertebrados (Campton, 1987), assim numerosos genes introgrididos têm sido reportados em peixes (Smith, 1992).

As análises genéticas e de biologia molecular nos scombrídeos têm sido difícil pela possível ocorrência neste grupo de explosões de especiação (Finnerty e Block, 1995), como sugerem as análises de relógio molecular, caracterizando um baixo grau de diferenciação aloenzimática entre as espécies do gênero *Thunnus* sugerindo uma radiação recente deste gênero, provavelmente dentro dos últimos 2 milhões de anos (Elliott e Ward, 1995). Estes fenômenos não são usuais na evolução e os scombrídeos podem ser uma exceção (Waits *et al.*, 1995).

Dentro dos tunídeos, várias pesquisas desenvolvidas foram feitas em espécies dos oceanos Pacífico e Índico onde são capturadas as maiores quantidades de atuns no mundo. As relações filogenéticas do gênero *Thunnus* encontram-se bem estudadas atualmente. Na Figura 1 podemos observar um cladograma baseado em caracteres morfológicos e vemos que o gênero *Allothunnus* tem sido colocado como o membro mais primitivo da tribo Thunnini, enquanto o gênero *Katsuwonus* é considerado o grupo irmão do gênero *Thunnus* (Collette e Russo, 1985; Collette, 1999). Estudos com alozimas (Elliott e Ward, 1995) e Citocromo B (Block *et al.*, 1993; Finnerty e Block, 1995) indicam um forte suporte molecular da monofilia do gênero *Thunnus* que é correspondente com os dados morfológicos. O gênero *Allothunnus* é parte da tribo Thunnini e continuação da tribo Sardinini (Collette *et al.*, 2001).

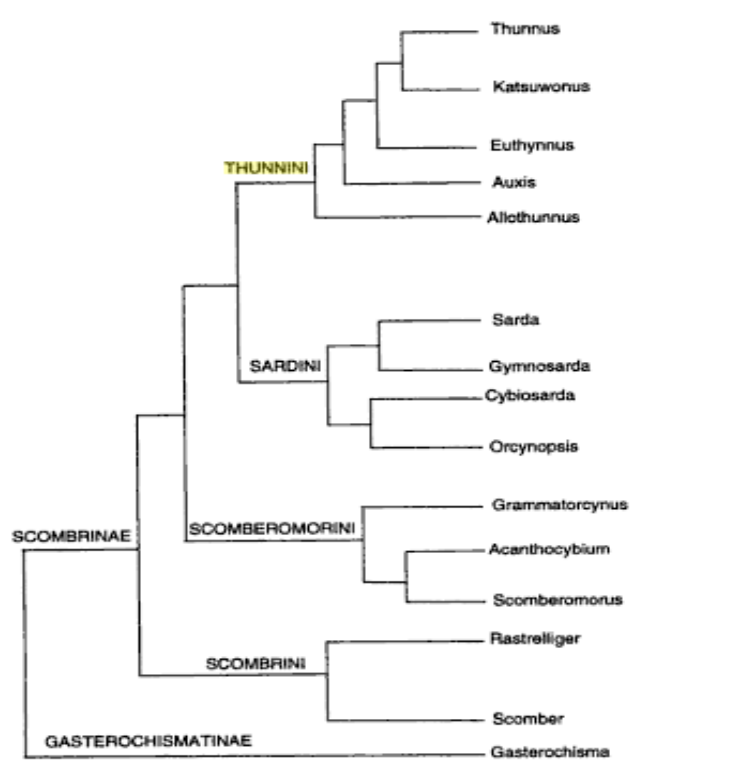


Figura 1. Cladograma, com base em caracteres morfológicos, da família Scombridae, segundo Collete e Russo (1985).

2. Objetivos

Considerando a relevância dos tunídeos em um contexto ecológico e sua importância mundial como um recurso econômico, além da urgente necessidade de medidas de conservação, este trabalho buscou desenvolver mecanismos de identificação molecular das espécies da tribo Thunnini, auxiliando na sua caracterização taxonômica e fornecendo dados a respeito da dinâmica populacional das espécies desta tribo, utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial. Tais resultados deverão servir para uma melhor identificação das espécies, auxiliando nas estatísticas pesqueiras, na caracterização das populações existentes e na delimitação de áreas prioritárias para programas de conservação e manejo.

Para o desenvolvimento do trabalho, são listados os objetivos operacionais:

- Auxiliar na identificação das espécies dos gêneros *Thunnus*, *Scomberomorus*, *Scomber*, *Sarda*, *Acantocybium*, *Auxis*, *Euthynnus* e *Katsuwonus*, utilizando sequências nucleotídicas mitocondriais.
- Gerar subsídios para programas de manejo adequados e exploração sustentável dos estoques pesqueiros de espécies da tribo Thunnini do Atlântico.

3. Material e Métodos

As análises genéticas do presente estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

3.1 Amostras coletadas

Foi amostrado um total de 648 indivíduos de *Thunnus albacares*, *T. obesus*, *T. alalunga*, *T. atlanticus*, *Scomberomorus brasiliensis*, *Scomberomorus regalis*, *Scomberomorus cavalla*, *Scomber colias*, *Katsuwonus pelamis*, *Euthynnus alleteratus*, *Sarda sarda*, *Sarda chiliensis*, *Sarda orientalis*, *Auxis thazard*, *Auxis rochei* e *Acantocybium solandri* (Tabela 1 e Figura 1 do manuscrito do capítulo I).

As identificações morfológicas foram realizadas seguindo chaves taxonômicas ou com a ajuda de especialistas. Depois de catalogadas as amostras foram depositadas na Coleção do Laboratório de Biologia e Genética (LBP), credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. Para gerar sequências de referência são analisados inicialmente exemplares obtidos inteiros e pelo menos um exemplar de cada espécie foi mantido como voucher para estudos futuros. Mas, em alguns casos, os exemplares não puderam ser armazenados devido ao enorme tamanho, porém foi registrado fotografias para a identificação das espécies. As amostras foram coletadas por pesquisadores

ou obtidas diretamente dos pescadores e o tecido muscular ou nadadeira foi preservado em etanol 95% e mantido refrigerado até a chegada ao laboratório, onde são mantidos em freezer comum.

3.2 Extração e sequenciamento do DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado pequenos fragmentos de tecido retirados de nadadeiras ou tecido muscular, aplicando a metodologia de solução salina descrita por Aljanabi *et al.* (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio, ou com placa de fibra de vidro seguindo as instruções do fabricante (Inanova *et al.*, 2006).

Para a identificação molecular das espécies foi amplificado uma sequência parcial do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de 650 pares de bases (pb), empregando os *primers*: Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e Fish R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3' descritos por Ward *et al.* (2005) e já testados com representantes de um grande número de ordens de peixes marinhos, conforme resultados descritos no trabalho citado, e uma região parcial da região controle D-loop de 1044 pb empregando os *primers* DLB 5'-AGC RYC GGT CTT GTA ATC CG-3 e DLA 5'-TCC YAC CCC TAA CTC CCA AAG-3 (descritos no presente estudo).

3.2.1 Amplificação dos genes mitocondriais

Os processos utilizados na amplificação dos genes mitocondriais contém os seguintes reagentes:

Tabela 1. Reação empregando a *PHT taq* polimerase

Reagentes	Volume
PHT 5U/ul	0,1 ul
Buffer 10X	2,50 µl
dNTP (2mM)	0,25 µl
Primer Forward (5uM)	0,50 µl
Primer Reverse (5uM)	0,50 µl
DNA Genômico (30ng/ul)	1,00 µl
Água Milli-Q	7.69 µl
Volume Total	12,50 µl

Levam-se os microtubos a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Tabela 2. Programa de PCR do gene COI e D-loop

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94° C	4'
2	Desnaturação	94°C	30''
3	Anelamento	54°C	1'
4	Extensão	72°C	2'
5	Volta para o passo 2		28X
6	Extensão Final	72°C	4'

3.2.2 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% (0,1g de agarose/1ml de tampão TAE 1X), corados com gelred (a trademark of Biotium). Os produtos amplificados foram comparados com o ladder 1kb plus (Invitrogen™), para ver o tamanho molecular das bandas, visualizadas no transiluminador e fotografadas com a câmera digital como se pode observar na Figura 2.

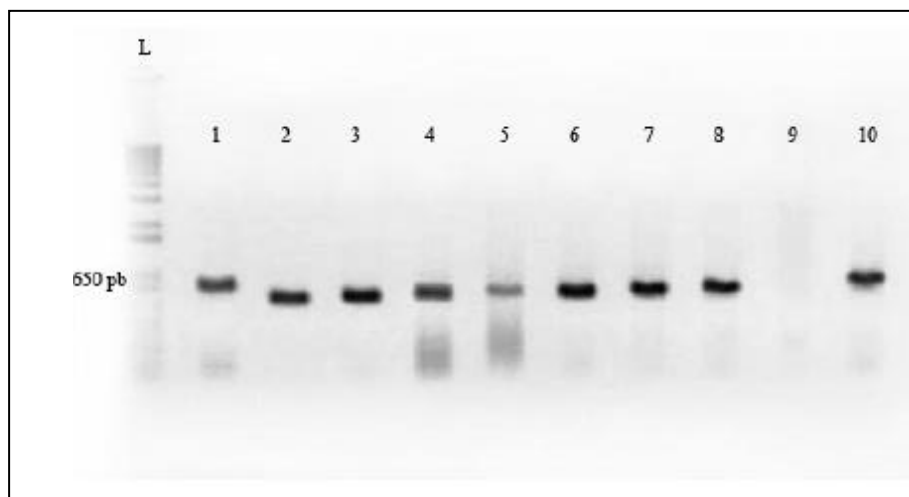


Figura 2. Gene COI, em gel de agarose a 1%. O ladder representado na primeira coluna.

3.2.3 Purificação das Amostras Amplificadas

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

Limpeza com Exosap I:

1: Em um tubo *eppendorf* prepara-se uma reação contendo 5,0 µl do DNA amplificado juntamente com 2,0 µl da solução de ExoSap I e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Tabela 3. Programa de limpeza com Exosap I.

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

3.2.4 Reação para PCR de Sequenciamento

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

Tabela 4. Reação para PCR de sequenciamento.

Reagente	Volume
Big DyeTM Terminator	0,70 µl
Buffer do Big DyeTM Terminator	1,05 µl
Primer F e R (5µM)	0,70 µl

DNA	1,00 µl
Água Milli-Q	3,90 µl
Volume total	7,00 µl

2. Levam-se os *eppendorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Tabela 5. Programa de PCR de sequenciamento.

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Denaturação Inicial	94° C	3'
2	Denaturação	94°C	30''
3	Anelamento	56°C	1'
4	Extensão	68°C	2'
5	Volta para o passo 2		30X
6	Extensão Final	68°C	4'

3.2.5 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 Sódio (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.

3.3 Sequenciamento do 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 e no sequenciador ABI3730 (*Perking-Elmer*) do Laboratório de bioinformática do Instituto FIOCRUZ em Belo Horizonte.

3.4 Obtenção de sequências consenso

As sequências obtidas do gene COI e o D-loop com os primers *Forward* e *Reverse* foram analisadas empregando o programa Geneious v.4.8.5 (Biomatters), 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. Após essa etapa, as sequências consenso de cada indivíduo foram passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão txt).

4. Alinhamento das sequências e Análise dos dados

4.1 Alinhamento das sequências e construção das matrizes

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas usando o programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>) (Edgar, 2004). Logo alinhadas manualmente empregando o Bioedit (Hall, 1999).

Duas matrizes foram construídas uma do gene COI de 652 pares de bases (pb) e outra do D-loop de 1044 pb. Para a sequência parcial do gene COI 257 pb (39,42%) foram variáveis sendo desses 213 pb (32,67%) informativos para máxima parcimônia. Para a sequência do D-loop, 373 pb foram conservadas e 615 pb (58,90%) foram variáveis dos quais 533 pb (51,05%) informativas para máxima parcimônia. A composição nucleotídica para o gene COI foi 29,0% (T), 28,5% (C), 23,8 (A), 18,7 (G) e para o D-loop foi de 32,2% (T), 15,6% (C), 29,7% (A), 22,5% (G). O programa Mega v5.1 (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica (evolução genética) que melhor se ajustava aos dados obtidos nas matrizes. O modelo de substituição de nucleotídeos nos permite estimar como ocorreram as mudanças entre as sequências ao longo do tempo. Os modelos de substituição sugeridos pelo Mega para a matriz do gene COI é K2+G e para a matriz do D-loop é TN93+G. Para uma melhor estimação de nossos dados a matriz do COI foi particionada considerando a posição das bases nucleotídicas (1era, 2da e 3era posição), os melhores modelos de evolução obtidos para cada posição foi K2, JC, JC respectivamente, correspondendo às diferentes taxas mutacionais que cada posição apresenta, mais a matriz do D-loop que não foi particionada já que este não é uma região codificante de proteína.

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

Método de distância Neighbour-joining

As análises filogenéticas baseadas por esse método foram realizadas com o programa MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2011). As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap*, com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Método de Máxima Verossimilhança (ML)

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/>, com 1000 pseudoreplicas, empregando o modelo evolutivo GTR.

Método de Máxima parcimonia (MP)

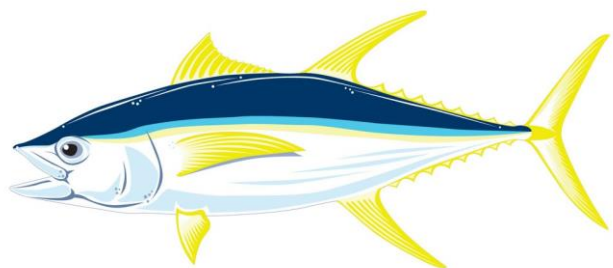
Foi efetuado através do PAUP (Swofford, 2002) empregando 1000 réplicas .

5. Resultados

Os resultados serão mostrados nos seguintes capítulos:

- 1- DNA barcode of tunas and allied species (Teleostei: Scombridae) in South America: effectiveness and limitations
- 2- Análise filogeográfica e estrutura genética populacional do atum patudo (*Thunnus obesus*) e do bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*) na costa brasileira e peruana (Scombridae: Thunnini)

Capitulo 1



DNA barcode of tunas and allied species (Teleostei: Scombridae) in South America: effectiveness and limitations

Abstract

Tunas, bonitos and mackerels are marine pelagic fishes distributed in the tropical and subtropical oceans of the world. They are highly captured and traded throughout their distribution area being the eight species of the genus *Thunnus* those with higher commercial value. Correct species identification in fisheries is needed to take better conservation measures and efficient fisheries management. In recent decades the methodology of DNA barcode has gained popularity, assisting in the difficult task of species identifications. The cutoff limit ($>2\%$) proposed for the species separation has generated controversy, especially in those species where it is impossible to find a "barcode gap" due to fast genetic evolution, genetic introgression and hybridization processes. In this paper we test the efficiency of COI and D-loop in the separation and identification of the Scombridae species, with emphasis on *Thunnus*. Twenty fish species were analyzed with COI (648 specimens) and eighteen with D-loop (313 specimens). The COI discriminated 66% of the species analyzed, showing two independent lineages within *Sarda*, but the species of *Thunnus* were not separated. D-loop was efficient in the separation of all species tested with the congeneric average distance of 3.3% being this value 15 times the average found by the COI (0.22%), becoming a powerful tool for molecular identification of Scombridae, particularly of *Thunnus*.

Keywords: DNA barcode, molecular identification, mtDNA, biodiversity, fisheries

Introduction

Fishes are a morphologically diverse group of vertebrates with high morphologic plasticity (Victor *et al.* 2009; Becker *et al.* 2011; Zhang & Hanner 2012). Thus, the identification of fish species is difficult and in many cases almost impossible when we relied solely on morphological characters, because many of them are restrictilly applied or have extense sobreposition (Valentini *et al.* 2009; Becker *et al.* 2011). On the other hand, the recognition of fish species is not only of interest of taxonomists and systematists, but it is also very important in studies of natural history, ecology, conservation, fisheries management, dispersal patterns of eggs and larvae, estimation of recruitment and spawning areas and authentication of food products (Rasmussen *et al.* 2009; Victor *et al.* 2009).

Hebert *et al.* (2003 a,b) proposed that 650 bp of the 5' end of the cytochrome oxidase subunit I (COI) could be enough to differentiate all or at least the vast majority of animal species, such as a global bioidentification system, called DNA barcode. In the last decade, methodologies based on DNA barcode have becoming very popular (Ward *et al.* 2009). This new technique has accelerated the rate of discovery of species, rapidly allowing taxonomists, highlighting divergent taxa that may represent new species (Herbert *et al.* 2003; Stoeckle 2003; Dayrat 2005; Hebert & Ryan 2005; Savolainen *et al.* 2005; Mitchell 2008; Packer *et al.* 2009; Hebert *et al.* 2010; Allcock *et al.* 2011; Rosso *et al.* 2012; Collins *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2012; Taylor & Harris 2012; van Velzen *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2013). But the DNA barcode has been widely questioned by some biologists who resist, believing that only one sequence can not work for the discovery or species identification (Packer *et al.* 2009). At the present, applications of DNA barcode in fish has growing significantly in the field of conservation (Holmes *et al.* 2009; Steinke *et al.* 2009), illegal trade in endangered species (Frézal & Leblois 2008), management of fishing quotas, monitoring and

sustainable capture fisheries (Ramussen *et al.* 2009) as well as food safety and consumer fraud. Just as an example, the DNA barcode has shown that about 25% of the species offered in markets and restaurants in New York (USA) and Toronto (Canada) were poorly labeled or replaced (Wong & Hanner 2008).

To use the DNA barcode sequences for species identification it is necessary that the sequences be more similar among individuals of one species than those sequences of close related species. Recent studies show that often this happens (April *et al.* 2011), but there are exceptions to this rule, especially when there are mitochondrial sequences shared between closely related organisms, possibly as a result of hybridization (Johnson & Cicero 2002; Hebert *et al.* 2003b; Meyer & Pauley 2005; Park *et al.* 2007). An additional problem is related to the cutoff limit for inter- and intraspecific differences. As expected there is not a single value for all organisms and the identification of this value for each group has been a challenge for many researchers (Meyer & Pauley 2005; De Salle *et al.* 2005; De Salle 2006; Rubinoff *et al.* 2006; Hickerson *et al.* 2006; Dasmahapatra & Mallet 2006; Rach *et al.* 2008; Buhay 2009).

On the other hand, the mitochondrial control region (D-loop) is a genetic region with some sequences with high variability (Wolstenholme 1992), a consequence of a small selective pressure during evolution (Xu *et al.* 2010), with a substitution rate of evolution from three to five times higher than the rest of the mitochondrial genome (Aquadro & Greenburg 1983; Cann *et al.* 1984), making this sequence of mtDNA more variable (Ishida *et al.* 1994). This region is considered a good marker for investigations of genetic variation among or within closely related species (Xiaodong *et al.* 2010; Kang *et al.* 2011; Khanshour & Cothran 2013), being extensively used to study populational structure of many fishes (Alvarado Bremer *et al.* 1995, 1996, 1997, 1998; Rosel and Block 1996; Reeb *et al.* 2000), including tunas (Alvarado Bremer *et al.* 1998, 1999; Chow *et al.* 2000; Viñas & Tudela 2009).

Tunas, bonitos and mackerel belong to the Scombridae family that consists of 15 genera and 50 species of pelagic marine fishes (Collette *et al.* 2001) being high commercial interest in fisheries (Ward 1995). They represent the third marine group in consumption, constituting approximately 10% of all fish market (FAO 2008). For a long time the identification and separation of some of the species within the genus *Thunnus* have been almost impossible, due to morphological similarity and genetic introgression between some of the species (Chow & Kishino 1995). Viñas and Tudela (2009) analyzing *Thunnus* suggest that the best molecular marker for the separation of species within this genus could be the D-loop.

Considering the information cited above we apply the technique of DNA barcode in combination with the analysis of D-loop sequences to check if these marks could be used as a tool for species identification in the family Scombridae, particularly those often caught in the South American coast.

Material and Methods

Collection of samples

The specimens were obtained in fish landings, tuna companies and fish markets from different locations of the Brazil, Venezuela, Colombia and Peru during three years, totaling 648 specimens belonging to 16 species (Table 1, Figure 1). For comparison purposes we also used 61 sequences deposited at GenBank (Table 2).

DNA Extraction, PCR, and Sequencing

A small piece of tissue was taken from animals collected and preserved in 96% ethanol until DNA extraction. The extraction was carried out with the plate glass fiber DNA extraction following the manufacturer's instructions (Ivanova *et al.* 2006). The PCR for

the COI gene (655 bp) and the D-loop (1044 bp) were loaded into a reaction of 12.5µl, containing 1.25µl of 10 X PCR buffer, 0.25µl of MgCl₂ (50 mM), 0.2 µl dNTPs (2 mM), 0.5 µl of each primer (5 mM), 0.1µl de 1.25 U of pht DNA Taq polymerase, and 1µl of genomic DNA (200 ng). The PCR cycles were down the following conditions: 94°C x 5 min, 30 cycles of 94°C for 40 s, 50°C-54°C for 30s, 68°C for 1 min, and 72°C for 8 min, using the primes Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' and Fish R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3' (Ward *et al.* 2005) for COI and DLB 5'-AGC RYC GGT CTT GTA ATC CG-3' and DLA 5'-TCC YAC CCC TAA CTC CCA AAG-3' (present study) for D-loop. The PCR products were checked on agarose gel at 1%. All PCR products were sequenced using the BigDye sequencing kit cycle terminators (Applied Biosystems, California, USA) according to the manufacturer's instructions and finally the sequences were analyzed using ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

Data analysis

The DNA sequences obtained were aligned using Geneious v4.8.5 software (Kearse *et al.* 2012). Alignments were optimized using MUSCLE v3.6 (Edgar 2004) and visually verified. Nucleotide saturation was assessed by plotting transitions and transversions using DAMBE v4.2.9 (Xia & Xie 2001). Two data matrix were created, one for each gene, and worked independently. The genetic distances among and within species were calculated using the Kimura-2-Parameter (K2P) distance model (Kimura 1980). A neighbor-joining (NJ) dendrogram of K2P distances including *bootstrap* analysis (Felsenstein 1985) with 1,000 replications was performed using MEGA v5.0 software to provide a graphic representation of the patterning of divergence among species (Tamura *et al.* 2011). Maximum parsimony (MP) phylogenies were obtained using PAUP v.4.10b (Swofford 2002) with heuristic search of 1,000 replicates. Maximum likelihood (ML) was done with RAxML v7.0.4 (Stamatakis *et al.*, 2006)

through CIPRES Portal (Miller *et al.* 2010) that uses a general time reversible (GTR) model of substitution with gamma model of rate heterogeneity, with 1,000 bootstrap replicates. All sequences were deposited into the BOLD (annex I) that generated the Barcode Index Number (BIN) from COI records (<http://www.boldsystems.org/bin>) and GenBank that generate numbers for both sequence groups.

Results

The sequences were deposited into the BOLD database. For COI the access numbers are BSCO314-14.COI-5P - BSCO962-14.COI-5P and for D-loop are BSCO001-14.D-loop - BSCO313-14.D-loop.

COI sequences: A total of 648 sequences were analyzed from four tribes of Scombridae (Thunnini, Sardini, Scomberomorini and Scombrini): 648 sequences (16 species) from the present study and 36 additional sequences (20 species) from GenBank. Within sequences no deletions, insertions and stop codons were found into the sequences which suggests that were not amplified NUMTs. The final matrix had 652 bp from which 257 bp (39.42%) were variable and 213 bp (32.67%) were informative for parsimony. The nucleotide composition was 29.0% (T), 28.5% (C), 23.8 (A) and 18.7 (G).

The BIN analyses in BOLD of the 648 records result in 13 unique BINs from which nine were discordant and only four concordant. The concordant BINs belong to the species *Acantocybium solandri*, *Sarda orientalis*, *Sarda sarda* and *Scomberomorus brasiliensis*. For the four species of *Thunnus* only one BIN was designated, this BIN constitute a case of discordance at species level. *Scomber colias* shown discordance at family level and this species has the greater discordance level among the species analyzed. *Auxis rochei*, *A. thazard*, *Euthynnus alletteratus*, *Katsuwonus pelamis* and

Scomberomorus cavalla present discordance at genus level; *Scomberomorus regalis* show discordance at species level. Finally *Sarda chiliensis*, *S. orientalis* and *S. sarda* were grouped together as a single species disagreeing at species and subspecies level.

Analyzing the dataset three identical topologies were obtained using NJ, ML and MP methods. We present here only the NJ tree with the statistical values obtained in the other analysis. The four tribes are well separated. Fifteen clades strongly supported by high bootstrap values can be observed, each containing one species, except that clade composed of eight *Thunnus* species (Fig 2 and Fig 3a).

Control Region (D-loop): 313 partial sequences of the D-loop were obtained from 16 species and 27 sequences were retrieved from GenBank summing a total of 340 sequences. A total of 1044 bp was sequenced, containing the hypervariable region 1 (HVR1). Within the 1044 bp, 615 bp (58.90%) were variables, of which 533 bp (51.05%) were informative for parsimony. The nucleotide composition was 32.2% (T), 15.6% (C), 29.7% (A) and 22.5% (G). Greater amounts (> 60%) of A + T is consistent with the trends found in the D-loop of other vertebrates (Wenink *et al.* 1993). The cladogram shows 19 clades strongly supported by high bootstrap index.

Twelve species of the tribe Thunnini were analyzed, seven of which belong to *Thunnus*, each clade contains one species with the exception of *T. obesus* which is divided in two clades. *Thunnus albacares* specimens were grouped into a single clade with intraspecific distance of 1.9% (Table 3) but small internal clades have been found with no significant *bootstrap* values (<50%), and a divergence between them ranging between 1.21% and 2.69% (data not shown). *Thunnus atlanticus* presents an intraspecific distance of 2.9%. Unlike the COI, the D-loop could clearly separate *T. albacares* of *T. atlanticus* with interspecific genetic divergence of 4.4% (Fig 4; Table 5).

Discussion

In South America there are 22 Scombridae or tuna species reported (Eschemeyer, 2014), but only five species (albacore, bigeye, bluefin, skipjack and yellowfin) are more frequently captured (FAO 2012). Due to overfishing and increased interest by certain species (FAO 2012) now it is also very difficult to obtain samples of many species, including those with low commercial value. But in the present study we managed to collect 16 species represented 72.72% of all species reported for South America.

The barcoding analyses show that all species of Scombridae analyzed can be identified with the COI sequences (Fig 2) with the exception of the species belonging to *Thunnus* (Fig 3a). On the other hand, all species can be correctly identified with D-loop sequences (Fig 4).

The tribe Sardini is represented in the present study by three species: *Sarda chiliensis*, *S. orientalis* and *S. sarda*. The COI data show a cogenetic distance ranging from 1.3% to 5.8 % and from 7.3% to 16% when we analyze the D-loop. The COI sequences permit to identify all three species. *S. sarda* was divided into three clades according to the collection site: Brazil, Venezuela and Turkey (the latter data retrieved from Genbank) (Fig 2), representing three of the five morphological populations of *S. sarda* described by Collette and Chao (1975). The intrapopulation divergence in COI ranges from 0 to 0.5% (Table 4) and the interpopulation divergence in COI ranges from 1.8 % to 2.2%, being *S. sarda* from Venezuela more similar to those from Turkey than those from Brazil. We observed that in COI *S. chiliensis* vs. *S. sarda* (Venezuela) show a genetic divergence of 1.3%, about a half the value of 2.1% found between *S. sarda* (Venezuela) vs. *S. sarda* (Brazil). A possible explanation for this separation (populations of Brazil and Venezuela) may be related with the Amazonas – Orinoco barriers that are the main barriers that produce break points between the faunas of north Brazil and the

Caribbean (Boehm *et al.* 2013). A barrier to gene flow is also found between two populations of *S. sarda* in the Mediterranean (Rey *et al.*, 1984; Roberti *et al.*, 1993; Pujolar *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 2004a) suggesting isolation by distance originated during the Pleistocene (Viñas *et al.*, 2004a). In the Figure 2 is observed a closer relationship between a *S. sarda* – Ve and *S. chiliensis* and paraphyly of *S. sarda* as reported by Viñas *et al.* (2010) due to ancestral introgression event about 3.5 Ma (Viñas *et al.*, 2010).

Four species of Scomberomorini were analyzed: *Acanthocybium solandri*, *Scomberomorus brasiliensis*, *S. regalis* and *S. cavalla*. The COI congeneric divergence ranges from 2.6% to 15.7%, with a genetic distance average between *Acanthocybium* and *Scomberomorus* of 15.3%. The D-loop congeneric divergence was 26.6% (Table 5).

Samples of *Acanthocybium solandri* from Natal/Brazil, were separated into three small subclades with a divergence in COI among them ranging from 0.46% to 0.72% and the D-loop analysis including the data retrieved from GenBank showed two clades (Fig 3c) with a *bootstrap* > 50%, being the distance between them 7.96% and within each clade were 4.08% (clade I) and 3.85% (clade II). Theisen *et al.* (2008), working with Cytb and six introns of LDH found a distance of 0.40%-0.60%, and these values are similar to that found in our database for the COI gene. These results suggest that more than one population may be found in this species.

For *Scomberomorus cavalla* COI data suggest a single unit among the samples collected in Natal/Brazil, with intraspecific distance of 0.1% (COI) and 1.7% for the D-loop (Table 3). *Scomber colias* was the only representative within the tribe Scombrini analyzed in the present study, with a COI intraspecific distance of 0.20% (Table 3). The genetic distance found here between genera (Table 4), *S. colias* vs. *E. alletteratus*, *S. colias* vs. *Auxis*, *S. colias* vs. *Thunnus* and *S. colias* vs. *Scomberomorus* (16.8%, 14.5%,

16.5% and 19.2 respectively), was similar to found by Catanese *et al.* (2010) analyzing *S. japonicus*, *S. colias* and *S. australasicus* complete mitochondrial DNA (16.5%, 16.2%, 16.3%, 17.0% respectively). The D-loop analysis showed an intraspecific distance of 0.2% (Table 4).

In the present study 12 species of Thunnini were analyzed with COI (Fig 2) and D-loop (Fig 4). The genetic distance within the tribe Thunnini ranged between 0.4% and 10.8% for the COI gene (Table 4) and 4.44% and 33.4% for D-loop (Table 5).

Katsuwonus pelamis (collected in Tumbes/Peru and São Paulo, Espírito Santo and Natal/Brazil), was divided in two clades in the D-loop analyses (Fig 3b) without strong *bootstrap* support (<50%), the distance within the each group was 4.38% and 4.60% and between both groups were 6.16%, but this separation is not related to the collection area, which could suggest two hypotheses: (1) there are more than one population, with different areas of reproduction but mixed in the high seas by the availability of food (Child 1984; Kotoulas *et al.* 1995; Spruell *et al.* 1999; Gerlach *et al.* 2001); and (2) a recent speciation occurring due to different natural selection pressures or geographical barriers, such as the formation of Panama's Isthmus, performed the contact between the populations of the Atlantic and Pacific has been reduced emerging significant differences as well as other pelagic species such as bigeye tuna (Alvarado Bremer *et al.* 1998; Chow *et al.* 2000), yellowfin tuna (Chow & Ushiyama 1995; Viñas *et al.* 2004b), Swordfish (Alvarado Bremer *et al.* 1995; Rosel & Block 1996), blue marlin (Finnerty & Block 1992) and sail fish (Graves & McDowell 1995).

The analysis of the COI sequences of *Thunnus* result in a large clade with all eight species currently recognized, the interspecific distances ranged between 0.4% to 1.7% for COI (Table 4) making impossible the identification and separation of species using this measurement, but from 4.4% to 18.4% for D-loop. *Thunnus obesus* was

divided in two clades, corresponding to samples from Peru and Brazil respectively, these results were corroborated by the COI and D-loop sequences, resulting in a COI genetic divergence within the clades of 0.5% and 0.2%, respectively, and between them 0.5% and in a D-loop genetic divergence within the clades of 2.5% and 2.4%, respectively, and between them 5.1%. Similar values (4.9%) were observed by Alvarado Bremer *et al.* (1998) using D-loop and analysing Pacific, Indian and Atlantic samples. Both clades (Atlantic and Pacific) have been reported by Alvarado Bremer *et al.* (1998), Chow *et al.* (2000); Durand *et al.* (2005) and Chiang *et al.* (2008) in studies employing the control region and microsatellite. But investigations with samples including or not the basin of the Atlantic did not find significant differences on the exist of more than one population (Appleyard *et al.* 2002; Grewe & Hampton 1998; Martines & Zardoya 2005; Gonzales *et al.* 2008). Today is accepted that the Atlantic Ocean has a single stock, ranging from environmental factors within the distribution area thus contributing to differences in population parameters (Duarte-Neto *et al.* 2012).

The intraspecific variation in *Thunnus albacares* is higher when compared with other *Thunnus* using COI as has been previously reported in studies using the ITS region (Chow *et al.* 2006). *Thunnus albacares* D-loop sequences presents an intraspecific distance of 1.9% and this value is low when compared with other studies with D-loop, taking into account the rapid mutation rate that it presents (Aquadro & Greenburg 1983). Kunal *et al.* (2013) in a study in India found 6.9% of the mean value found within populations, but our value agrees with that found by Alvarado Bremer *et al.* (1997) of 1.8% in a study with samples from northeastern Atlantic, with Ely *et al.* (2005) which finds a value 2.7% for samples from the northeastern Atlantic and Wu *et al.* (2010) with a mean value 2.55% studying populations of the Pacific and Indian. We found the formation of small clades (nine) with no significant *bootstrap* values (<50%) with a genetic distance within populations from 0 to 2.5% and interpopulation distance ranging

between 1.21% and 2.69% (data don't showed), values similar to those found by other researchers (Ely *et al.* 2005, Wu *et al.* 2010).

Thunnus alalunga, with 22 samples representing different haplotypes presented an intraspecific D-loop divergence of 2.80% and 22 different haplotypes. Our data show a single strongly supported clade (>90%) without any evidence of more than one population occurring in the collected area (São Paulo and Santa Catarina - Brazil) perhaps due to the small samples and little geographic separation between the collection points.

Conclusion

The COI sequence clearly discriminates most species belonging to Scombridae (66.16%) with the exception of *Thunnus*, for which there is no efficient separation, as previously reported by Ward *et al.* (2005) in a study of barcode fishes of Australia. The BIN analysis reinforces this observation since a single BIN was attributed to the four species of *Thunnus* used for this study and only three BINs were reported in the BOLD for all 263 *Thunnus* species already analyzed. Similar cases occurred in other species as in gastropods (Meyer *et al.* 2005) and butterflies (Wiemers & Fiedler 2007). In *Thunnus* the absence of a barcoding gap may be the result of genetic introgression in some species (Chow & Kishino 1995).

Comparing the average genetic distance within species (0.22%) of the COI (Table 6) observed that this value is below the average genetic distance within species of other studies with different species of freshwater and marine fish (0.30% Lakra *et al.* 2011; 0.31% Valdez-Moreno *et al.* 2010; 0.31% Oliveira Ribeiro *et al.* 2012; 0.32% Zahng 2011; 0.38% Rock *et al.* 2008; 0.39% Ward *et al.* 2005; 0.42% Steinke *et al.* 2009b) and consistent with some values from other studies (0.23% Mabragaña *et al.* 2011; 0.25% Steinke *et al.* 2009a). But this measure is 15 times more (3.3%) when we use the D-loop (Table 7) due to the different evolutionary rates of the sequences analyzed. The mean

genetic distance increased according to higher taxonomic levels (genera, tribes), supporting the idea of a significant change in the genetic divergence within the limits of the species (Hebert *et al.* 2003).

Finally the genetic data in this study allowed for the clear molecular identification within *Thunnus* using D-loop but this is not possible when we use the COI, mainly due to the different rates of evolution that both genetic regions exhibit. However in the case of species with gene introgression and rapid adaptive radiation a complement to DNA barcode is of great help for better identification and separation of the species. Both markers (COI and D-loop) could be used for forensic identification to nivel of genus and species respectively in the Scombridae family, assisting the fishery statistics and regulations as well as prevent consumer fraud.

Acknowledgements

We thank all the individuals and institutions who assisted us in the collection and identification of the specimens that served as the basis for this study, with special thanks to Nicolas Ehemann and IMARPE for the donation of tissue samples from Margarita Island in Venezuela and Peru respectively. Rodrigo Caires help with the specimens identification. This study was supported by the FAPESP.

Table 1. Specimens of *Acantocybium* (A.), *Auxis* (Au.), *Euthynnus* (E.), *Katsuwonus* (E.), *Sarda* (S.), *Scomberomorus* (Sc.), *Scomber* (Sco.) and *Thunnus* (T.) collected for this study. VE= Venezuela; BR = Brazil; PE= Peru; CO= Colombia.

Species	Locality	COI-Sample	Dloop- Sample	Map location
<i>Au.rochei</i>	Margarita Island-VE	1	1	2
<i>A.solandri</i>	Natal-BR	60	14	4
<i>Au.thazard</i>	Margarita Island-VE	3	0	2
<i>Au.thazard</i>	Natal-BR	1	0	4
<i>Au.thazard</i>	Santos-BR	3	0	8
<i>Au.thazard</i>	SP-Market	7	4	8
<i>E.alleteratus</i>	Santa Marta-CO	8	0	1
<i>E.alleteratus</i>	E.santo-BR	4	1	5
<i>E.alleteratus</i>	Margarita Island-VE	27	2	2
<i>E.alleteratus</i>	Itanhaem-BR	4	0	8
<i>K.pelamis</i>	E.santo-BR	10	19	5
<i>K.pelamis</i>	Natal-BR	18	5	4
<i>K.pelamis</i>	Paita-PE	19	15	10
<i>K.pelamis</i>	Santos-BR	8	13	8
<i>Sc.brasiliensis</i>	Belem-BR	9	0	3
<i>Sc.brasiliensis</i>	Bertioga-BR	1	0	7
<i>Sc.brasiliensis</i>	Cananeia-BR	11	0	8
<i>Sc.brasiliensis</i>	Margarita Island-VE	2	0	2
<i>Sc.brasiliensis</i>	Rio de Janeiro-BR	5	0	6
<i>Sc.brasiliensis</i>	SP-Market-BR	16	0	8
<i>Sc.brasiliensis</i>	Ubatuba-BR	3	0	7
<i>Sc.brasiliensis</i>	Itanhaém-BR	10	0	8
<i>Sc.cavalla</i>	Belem-BR	1	0	3
<i>Sc.cavalla</i>	Margarita Island-VE	2	0	2
<i>Sc.cavalla</i>	Natal-BR	8	6	4
<i>S.chiliensis</i>	Callao-PE	51	20	11
<i>Sco.colias</i>	Florianópolis-BR	37	0	9
<i>Sco.colias</i>	SP-Market-BR	18	0	8
<i>S.orientalis</i>	Callao-PE	2	0	11
<i>Sc.regalis</i>	Cananeia-BR	2	0	8
<i>Sc.regalis</i>	SP-Market-BR	1	0	8
<i>Sc.regalis</i>	Ubatuba-BR	1	0	7
<i>S.sarda</i>	Margarita Island-VE	14	0	2
<i>S.sarda</i>	SP-Market-BR	18	0	8
<i>T.alalunga</i>	Itajaí-BR	16	10	9
<i>T.alalunga</i>	Natal-BR	1	0	4
<i>T.alalunga</i>	SP-Market-BR	13	9	8
<i>T.alalunga</i>	Itanhaém-BR	0	1	8
<i>T.albacares</i>	E.santo-BR	2	1	5
<i>T.albacares</i>	Margarita Island-VE	3	2	2
<i>T.albacares</i>	Natal-BR	47	58	4
<i>T.albacares</i>	Paita-PE	7	13	10
<i>T.albacares</i>	Florianópolis-BR	19	0	9
<i>T.albacares</i>	Santos-BR	14	0	8
<i>T.albacares</i>	SP-Market-BR	20	35	8
<i>T.albacares</i>	Itanhaém-BR	15	5	8
<i>T.albacares</i>	Santa Marta - CO	1	0	1
<i>T.atlanticus</i>	E.santo-BR	11	18	5
<i>T.atlanticus</i>	Margarita Island-VE	12	1	2
<i>T.atlanticus</i>	Natal-BR	3	0	4
<i>T.atlanticus</i>	Florianópolis-BR	3	1	9
<i>T.atlanticus</i>	Santos-BR	4	0	8
<i>T.atlanticus</i>	Itanhaém-BR	0	2	8
<i>T.atlanticus</i>	SP-Market-BR	0	3	8
<i>T.obesus</i>	Natal-BR	12	5	4
<i>T.obesus</i>	Paita-PE	21	24	10
<i>T.obesus</i>	Florianópolis-BR	13	0	9
<i>T.obesus</i>	SP-Market-BR	21	23	8
<i>T.obesus</i>	Itanhaém-BR	5	2	8
Specimens number		648	313	
Species number		16	11	

Table 2. Sequences of *Acantocybium* (A.), *Auxis* (Au.), *Euthynnus* (E.), *Katsuwonus* (E.), *Sarda* (S.), *Scomberomorus* (Sc.), *Scomber* (Sco.) and *Thunnus* (T.) obtained from GenBank

Species	Locality	COI	D-loop
<i>A. solandri</i>	Belize	JQ840406.1	-
<i>A. solandri</i>	South Africa	JF492770.1	-
<i>A. solandri</i>	USA	-	EF695020.1
<i>A. solandri</i>	Bahamas	-	AF197158.1
<i>Au. rochei</i>	South Africa	JF492936.1/JF492935.1	-
<i>Au. rochei</i>	Spain		AB119171.1/AB119160.
<i>Au. thazard</i>	Turkey	KC500292.1/KC500290.1	
<i>Au. Thazard</i>	Indian		JN399000.1/JN399010.1
<i>E. alletteratus</i>	West Atlantic	DQ835902.1	
<i>E. affinis</i>	South Asia		AB519241.1/AB519240.1
<i>E. alletteratus</i>	Mexico	HM586986.1	
<i>E. alletteratus</i>	Spain		AB099716.1
<i>K. pelamis</i>	South Africa	HQ945894.1/JF493705.1	
<i>K. pelamis</i>			AY899511.1/AY899504.1
<i>S. orientalis</i>	Spain		EU287971.1/EU287967.1
<i>S. sarda</i>	Turkey	KC501212.1/KC501203.1	
<i>S. sarda</i>	Spain		AF390247.1/AF390240.1
<i>S. chiliensis</i>	USA	GU440511.1	
<i>S. chiliensis</i>		EU752179.1	
<i>S. chiliensis</i>	Spain		EU287985.1/EU287973.1
<i>Sc. brasiliensis</i>	West Atlantic	DQ835919.1	
<i>Sc. cavala</i>	Mexico	GU225662.1/GU225658.1	
<i>Sc. cavala</i>	Spain		HQ630703.1
<i>Sc. regalis</i>	West Atlantic	DQ835888.1	
<i>Sc. regalis</i>	Mexico	GU225663.1	
<i>Sco. colias</i>	Portugal	JQ775114.1/JQ775111.1	
<i>Sco. colias</i>	Spain		AB361497.1/AB361539.1
<i>T. alalunga</i>	Australia	DQ107659.1/DQ107658.1	
<i>T. alalunga</i>	Spain		AY571767.1/AY571774.1
<i>T. albacares</i>	Indian	EU392206.1	
<i>T. albacares</i>	Australia	DQ107652.1	
<i>T. albacares</i>	China		JN572788.1/JN572786.1
<i>T. atlanticus</i>	Australia	DQ107583.1/DQ107582.1	
<i>T. atlanticus</i>	Spain		HQ630706.1
<i>T. macoyii</i>	Australia	DQ107639.1/DQ107641.1	
<i>T. obesus</i>	Australia	DQ107630.1/DQ107642.1	
<i>T. orientalis</i>	Australia	DQ107581.1/DQ107592.1	AB933631.1/ AB933628.1
<i>T. thynnus</i>	Australia	DQ107589.1	
<i>T. thynnus</i>	Spain		HM359211.1/HM359205.1
<i>T. tonggol</i>	Australia	DQ107635.1/DQ107636.1	KC313377.1/ KC313380.1

Table 3. Intraspecific genetic distance calculated using the Kimura-2-parameter model for the analyzed samples.

Species	COI	Species	D-loop
<i>A. rochei</i>	0.004±0.002	<i>A. rochei</i>	0.071±0.010
<i>A. solandri</i>	0.004±0.001	<i>A. solandri</i>	0.061±0.006
<i>A. thazard</i>	0.002±0.001	<i>A. thazard</i>	0.042±0.005
<i>E. affinis</i>	-		0.010±0.006
<i>E. alletteratus</i>	0.002±0.001	<i>E. alletteratus</i>	0.021±0.004
<i>K. pelamis</i>	0.003±0.001	<i>K. pelamis</i>	0.053±0.005
<i>S. brasiliensis</i>	0.004±0.001	-	-
<i>S. cavalla</i>	0.001±0.001	<i>S. cavalla</i>	0.017±0.003
<i>S. chiliensis</i>	0.001±0.000	<i>S. chiliensis</i>	0.021±0.003
<i>S. colias</i>	0.002±0.000	<i>S. colias</i>	0.002±0.002
<i>S. orientalis</i>	0.000±0.000	<i>S. orientalis</i>	0.046±0.011
<i>S. regalis</i>	0.003±0.002	-	-
<i>S. sarda</i> Brazil	0.001±0.000	<i>S. sarda</i>	0.080±0.010
<i>S. sarda</i> Venezuela	0.005±0.001	-	-
<i>S. sarda</i> Turkey	0.000±0.000	-	-
<i>T. alalunga</i>	0.001±0.001	<i>T. alalunga</i>	0.028±0.003
<i>T. albacares</i>	0.003±0.001	<i>T. albacares</i>	0.019±0.002
<i>T. atlanticus</i>	0.002±0.001	<i>T. atlanticus</i>	0.029±0.004
<i>T. macoyii</i>	0.003±0.002	-	-
<i>T. obesus</i> Atlantic	0.005±0.001	<i>T. obesus</i> Atlantic	0.024±0.003
<i>T. obesus</i> Pacific	0.002±0.001	<i>T. obesus</i> Pacific	0.025±0.003
<i>T. orientalis</i>	0.000±0.000	<i>T. orientalis</i>	0.033±0.006
<i>T. thynnus</i>	n/c	<i>T. thynnus</i>	0.011±0.005
<i>T. tonggol</i>	0.002±0.002	<i>T. tonggol</i>	0.028±0.008

Table 4. Interspecific genetic distance (Kimura-2-parameter model) using COI sequences.

Specie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>Sco.colias</i>		0.019	0.019	0.018	0.018	0.019	0.018	0.018	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.017	0.017	0.018	0.016	0.016	0.016	0.019	0.020	0.020
2. <i>A.solandri</i>	0.184		0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.016	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.017	0.017	0.017
3. <i>S.orientalis</i>	0.192	0.133		0.009	0.009	0.010	0.009	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.015	0.016	0.016	0.015	0.018	0.018	0.018
4. <i>S.sarda</i> Venezuela	0.174	0.114	0.056		0.005	0.005	0.004	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.018	0.016	0.017
5. <i>S.sarda</i> Brazil	0.174	0.111	0.047	0.021		0.005	0.005	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.018	0.017	0.017
6. <i>S.sarda</i> Turkey	0.189	0.110	0.058	0.018	0.022		0.005	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015	0.017	0.017	0.017
7. <i>S.chiliensis</i>	0.175	0.109	0.052	0.013	0.021	0.019		0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.018	0.016	0.017
8. <i>T.alalunga</i>	0.169	0.124	0.122	0.105	0.104	0.105	0.106		0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005	0.005	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.016	0.017
9. <i>T.albacares</i>	0.164	0.126	0.119	0.100	0.100	0.105	0.103	0.016		0.002	0.002	0.002	0.003	0.005	0.003	0.002	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
10. <i>T.obesus</i> Atlantic	0.163	0.125	0.121	0.101	0.100	0.105	0.105	0.017	0.006		0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
11. <i>T.obesus</i> Pacific	0.163	0.123	0.121	0.101	0.100	0.105	0.105	0.016	0.006	0.005		0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
12. <i>T.atlanticus</i>	0.167	0.167	0.118	0.098	0.100	0.105	0.102	0.015	0.005	0.009	0.009		0.004	0.005	0.004	0.003	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
13. <i>T.macoyii</i>	0.163	0.126	0.117	0.104	0.100	0.105	0.105	0.015	0.009	0.010	0.010	0.012		0.005	0.003	0.004	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
14. <i>T.orientalis</i>	0.169	0.125	0.121	0.108	0.103	0.108	0.109	0.004	0.015	0.016	0.016	0.015	0.014		0.005	0.005	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.016	0.017
15. <i>T.thynnus</i>	0.165	0.121	0.117	0.101	0.100	0.101	0.102	0.015	0.007	0.008	0.008	0.010	0.008	0.014		0.004	0.013	0.013	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
16. <i>T.tonggol</i>	0.160	0.126	0.119	0.100	0.101	0.107	0.104	0.017	0.004	0.007	0.007	0.006	0.010	0.016	0.009		0.013	0.012	0.012	0.013	0.019	0.017	0.017
17. <i>E.alletteratus</i>	0.168	0.130	0.125	0.109	0.110	0.122	0.115	0.100	0.088	0.089	0.089	0.090	0.093	0.096	0.091	0.084		0.012	0.013	0.013	0.019	0.018	0.018
18. <i>K.pelamis</i>	0.161	0.139	0.123	0.123	0.123	0.122	0.121	0.100	0.103	0.104	0.103	0.101	0.108	0.100	0.106	0.098	0.088		0.010	0.011	0.019	0.018	0.018
19. <i>Au.rochei</i>	0.146	0.118	0.128	0.107	0.109	0.113	0.104	0.092	0.090	0.091	0.090	0.089	0.091	0.091	0.088	0.087	0.095	0.066		0.006	0.019	0.018	0.018
20. <i>Au.thazard</i>	0.144	0.127	0.118	0.108	0.111	0.112	0.106	0.101	0.099	0.100	0.100	0.098	0.098	0.101	0.097	0.096	0.092	0.069	0.026		0.019	0.018	0.018
21. <i>Sc.cavalla</i>	0.192	0.150	0.152	0.157	0.151	0.150	0.153	0.172	0.168	0.170	0.170	0.168	0.168	0.167	0.166	0.164	0.171	0.170	0.168	0.162		0.017	0.018
22. <i>Sc.regalis</i>	0.194	0.157	0.144	0.144	0.149	0.147	0.144	0.141	0.143	0.144	0.145	0.143	0.145	0.141	0.143	0.144	0.163	0.155	0.160	0.156	0.143		0.006
23. <i>Sc.brasiliensis</i>	0.19	0.152	0.156	0.151	0.148	0.154	0.144	0.156	0.151	0.152	0.152	0.151	0.152	0.151	0.150	0.152	0.166	0.165	0.159	0.155	0.157	0.026	

Table 5: Interspecific genetic distance (Kimura-2-parameter model) using D-loop sequences.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>T. tonggol</i>		0.020	0.024	0.017	0.020	0.016	0.020	0.020	0.030	0.029	0.029	0.038	0.030	0.030	0.027	0.032	0.030	0.033	0.032
2. <i>T. orientalis</i>	0.164		0.025	0.014	0.010	0.014	0.013	0.012	0.022	0.024	0.019	0.041	0.022	0.019	0.021	0.031	0.021	0.025	0.023
3. <i>T. thynnus</i>	0.184	0.222		0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.031	0.031	0.030	0.034	0.030	0.031	0.030	0.031	0.036	0.041	0.035
4. <i>T. atlanticus</i>	0.131	0.138	0.106		0.010	0.006	0.007	0.007	0.019	0.020	0.017	0.032	0.018	0.016	0.018	0.028	0.018	0.024	0.021
5. <i>T. alalunga</i>	0.182	0.097	0.125	0.100		0.010	0.010	0.010	0.020	0.021	0.017	0.033	0.020	0.017	0.017	0.027	0.020	0.024	0.020
6. <i>T. albacares</i>	0.129	0.144	0.102	0.044	0.096		0.007	0.007	0.019	0.020	0.017	0.033	0.018	0.017	0.019	0.031	0.019	0.024	0.020
7. <i>T. obesus</i> Atlantic	0.151	0.142	0.114	0.063	0.098	0.057		0.006	0.018	0.019	0.017	0.030	0.019	0.016	0.017	0.028	0.019	0.023	0.020
8. <i>T. obesus</i> Pacific	0.152	0.127	0.114	0.064	0.097	0.057	0.051		0.019	0.020	0.017	0.032	0.019	0.016	0.018	0.031	0.019	0.023	0.021
9. <i>Au. thazard</i>	0.291	0.273	0.267	0.232	0.250	0.225	0.225	0.239		0.010	0.013	0.027	0.015	0.016	0.016	0.027	0.019	0.025	0.022
10. <i>Au. rochei</i>	0.309	0.286	0.290	0.240	0.250	0.233	0.226	0.239	0.097		0.015	0.025	0.016	0.017	0.017	0.025	0.019	0.026	0.024
11. <i>K. pelamis</i>	0.277	0.249	0.274	0.223	0.231	0.223	0.223	0.224	0.168	0.167		0.022	0.014	0.015	0.015	0.027	0.017	0.022	0.018
12. <i>E. affinis</i>	0.299	0.334	0.259	0.242	0.281	0.247	0.234	0.248	0.190	0.209	0.156		0.018	0.028	0.029	0.035	0.040	0.044	0.044
13. <i>E. alletteratus</i>	0.268	0.261	0.264	0.219	0.250	0.221	0.225	0.234	0.179	0.170	0.145	0.110		0.015	0.016	0.030	0.019	0.027	0.019
14. <i>S. sarda</i>	0.288	0.244	0.270	0.204	0.224	0.216	0.212	0.215	0.217	0.216	0.204	0.213	0.200		0.008	0.021	0.017	0.023	0.018
15. <i>S. chiliensis</i>	0.258	0.242	0.268	0.209	0.209	0.219	0.207	0.218	0.214	0.210	0.208	0.235	0.204	0.073		0.021	0.018	0.024	0.020
16. <i>S. orientalis</i>	0.268	0.284	0.263	0.235	0.253	0.265	0.247	0.268	0.242	0.239	0.258	0.274	0.247	0.160	0.153		0.028	0.035	0.035
17. <i>Sc.cavalla</i>	0.312	0.266	0.316	0.250	0.258	0.247	0.242	0.253	0.237	0.243	0.224	0.323	0.234	0.235	0.252	0.268		0.024	0.020
18. <i>Sco. colias</i>	0.350	0.355	0.371	0.312	0.331	0.314	0.311	0.311	0.343	0.339	0.324	0.372	0.363	0.343	0.326	0.345	0.348		0.025
19. <i>A. solandri</i>	0.351	0.312	0.366	0.288	0.291	0.284	0.282	0.281	0.290	0.299	0.265	0.406	0.261	0.262	0.281	0.371	0.266	0.370	

Table 6 Summary of the genetic distance (Kimura-2-parameter model) within each taxonomic level based in the COI sequences.

Comparisons	Taxa	Min. distance (%)	Mean distance (%)	Max. Distance (%)
Whitin Species	21	0	0.22 $\pm$ 0.16	0.48
Whitin Genus	17	0.16	1.11 $\pm$ 1.61	4.98
Whitin Tribe	14	0.16	3.88 $\pm$ 3.54	9.17

Table 7 Summary of the genetic distance (Kimura-2-parameter model) among each taxonomic level based in the D-loop sequences.

Comparisons	Taxa	Min. distance (%)	Mean distance (%)	Max. Distance (%)
Whitin Species	18	0.2	3.30 $\pm$ 2.0	7.1
Whitin Genus	15	0.2	4.71 $\pm$ 2.31	6.8
Whitin Tribe	6	0.2	7.92 $\pm$ 5.78	14.79

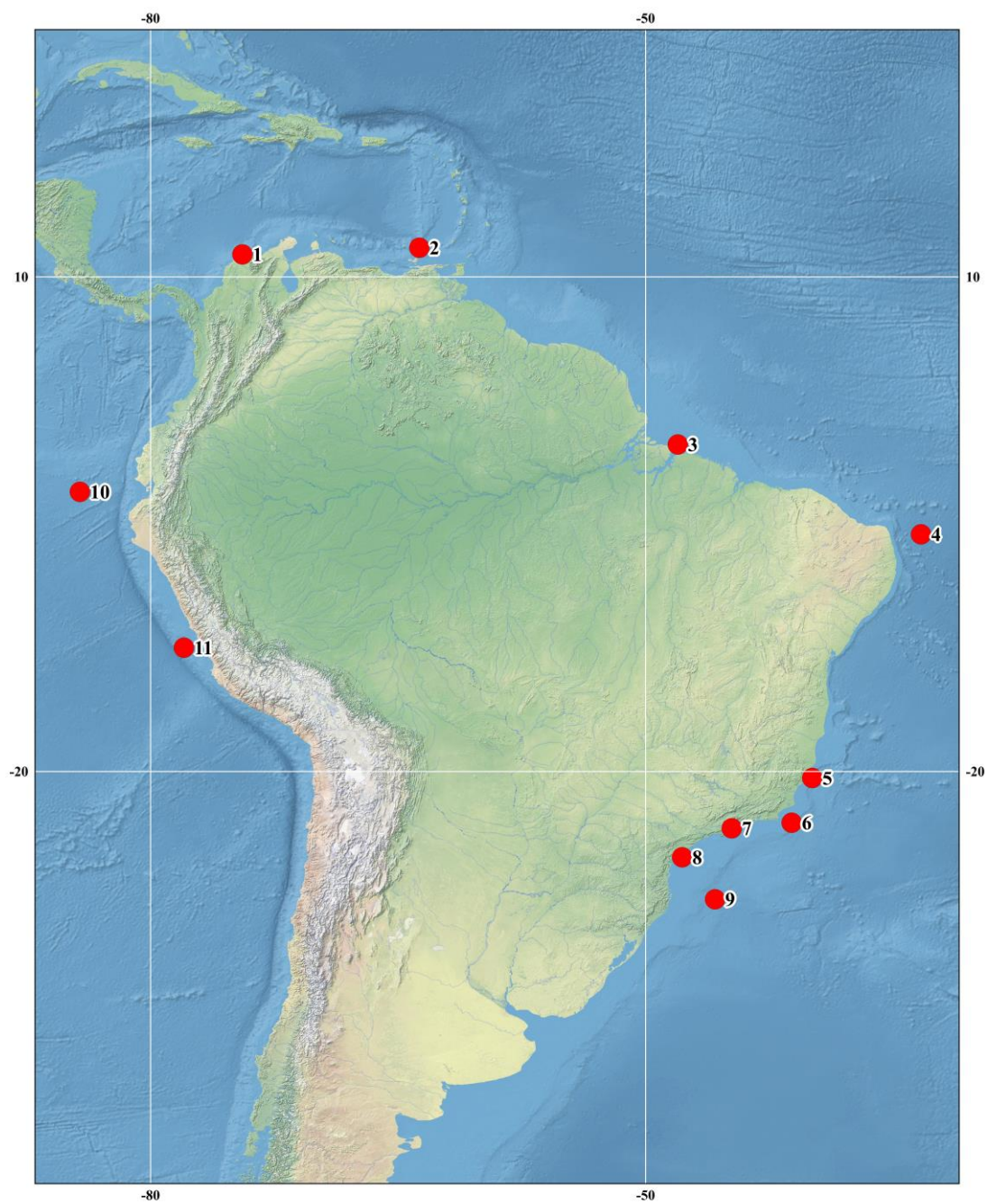


Fig 1. Map showing the collection points of samples analyzed in the present study.

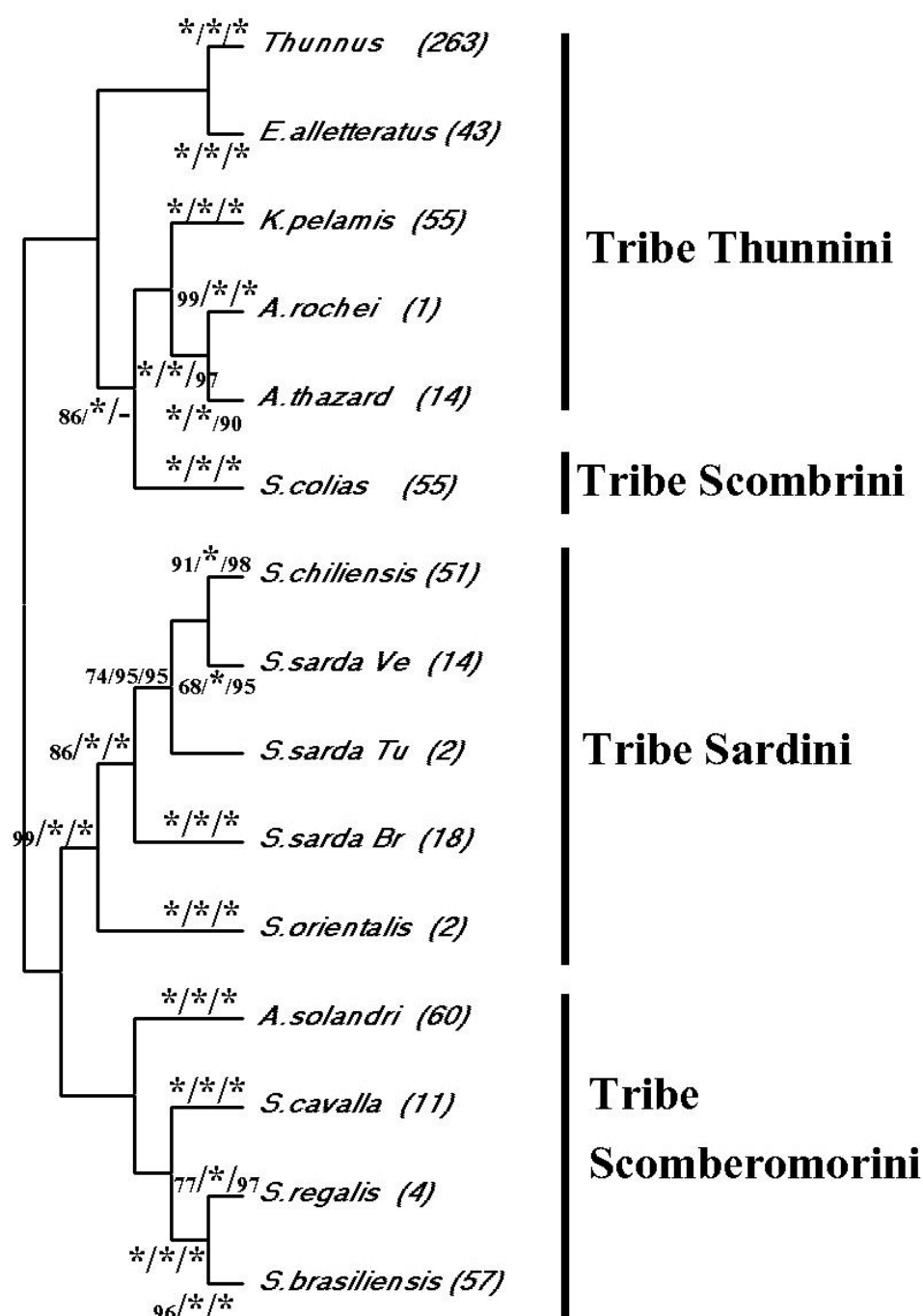


Fig. 2 Majority-rule consensus dendrogram obtained by NJ analysis (Kimura-2-parameter model) using COI sequences. The numbers from left to right are probability values of NJ, maximum parsimony and maximum likelihood. The values were obtained using 1,000 bootstrap replicas. The asterisk represents 100% of *bootstrap*. Numbers in parenthesis represent the amount of specimens analyzed.

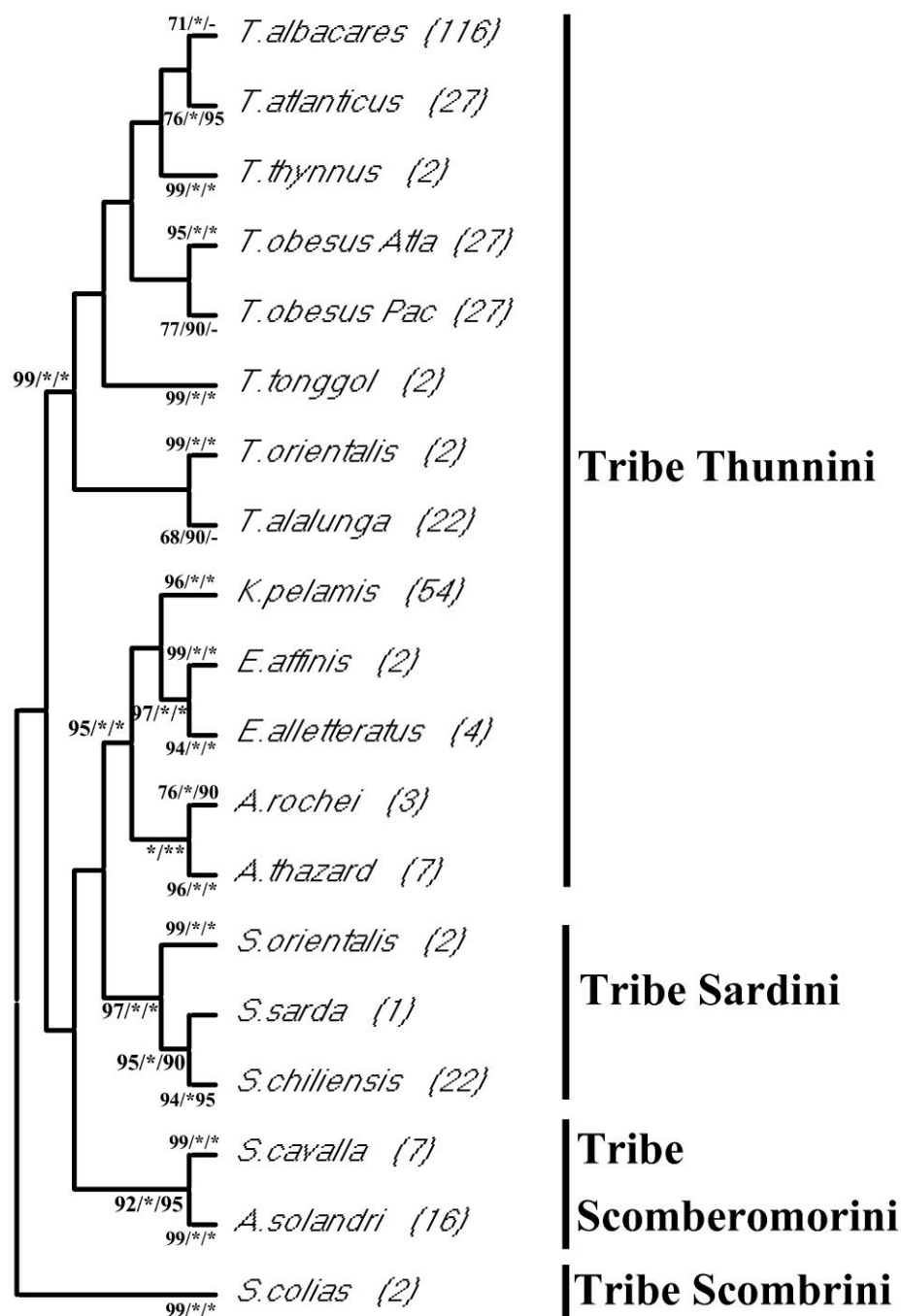


Fig. 4 Majority-rule consensus dendrogram obtained by NJ analysis (Kimura-2-paramer model) using D-loop sequences. The numbers from left to right are probability values of NJ, maximum parsimony and maximum likelihood. The values were obtained using 1,000 bootstrap replicas. The asterisk represents 100% of *bootstrap*. Numbers in parenthesis represent the amount of specimens analyzed.

Capitulo 11



**Análise filogeográfica e estrutura genética populacional do atum patudo,
Thunnus obesus, e do bonito listrado, *Katsuwonus pelamis* (Scombridae: Thunnini)
na costa brasileira e peruana**

Resumo

Dentro dos atuns e bonitos comercializados mundialmente destacam-se o atum patudo (*Thunnus obesus*) e o bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*), sendo espécies amplamente capturadas ao longo de toda sua distribuição. Durante muito tempo, várias pesquisas foram desenvolvidas, visando identificar a dinâmica populacional destas espécies em diferentes bacias oceânicas, porém com poucos estudos realizados no Atlântico e com poucos registros no Brasil. Nesse sentido o presente trabalho buscou analisar e comparar grupos amostrais nos oceanos Atlântico e Pacífico das duas espécies citadas para acessar a dinâmica populacional e verificar a existência de uma possível correlação entre a distribuição geográfica e agrupamentos genéticos. Para isto amplificamos 860 pb da região controle do DNA mitocondrial de 103 indivíduos (54 de *T. obesus* e 53 de *K. pelamis*) coletados no sudeste e nordeste do Brasil na bacia do Atlântico e no Peru na bacia do Pacífico. As análises mostram uma forte estruturação genética entre os oceanos Atlântico e Pacífico ($\Phi_{ST} = 0.48$, $p < 0,01$), com a identificação de dois estoques de *T. obesus*, o isolamento possivelmente devido à formação do Istmo do Panamá e ao surgimento da ressurgência de Benguela. Em *K. pelamis* encontramos uma forte estruturação ($\Phi_{ST} = 0.38$, $p < 0,01$) entre duas populações encontradas misturadas em ambos oceanos, possivelmente devido aos diferentes períodos de oscilação no nível do mar, o que levou em um primeiro momento, a um isolamento populacional, que deve ter sido seguido de uma mistura

geográfica das populações que, aparentemente, se encontram geneticamente isoladas até o presente.

1. Introdução

Os atuns são grandes peixes pelágicos pertencentes à família Scombridae, com uma distribuição geográfica cosmopolita, grande tamanho efetivo populacional (Waples 1987; Avise 1998; Nesbo *et al* 2000; Zardoya *et al* 2004) e aparentemente não apresentam barreiras físicas para a dispersão no oceano, aumentando assim a possibilidade de panmixia (Palumbi 1994; Martínez *et al* 2002). Há mais de uma década existem estudos filogeográficos e de populações neste grupo de peixes e de outros grandes migradores marinhos (Alvarado Bremer *et al.*, 2005; Buonnacorsi *et al.*, 2001; Martínez e Zardoya 2005; Graves e McDowell, 2003; Carlsson *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2004; Viñas *et al.*, 2004a,b; Gonzales *et al.*, 2008; Duetto- Neto *et al.*, 2012) porém algumas pesquisas mostram evidências de estruturação populacional, baseadas em estudos ecológicos, de comportamento, recrutamento e análises genéticas usando DNA mitocondrial e nuclear (Carlsson *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2004; Reeb *et al.*, 2000; Viñas *et al.*, 2004b; Zardoya *et al.*, 2004) enquanto outras investigações refutam algumas destas ideias (Graves *et al.*, 1984; Ely *et al* 2005).

Entre os principais atuns comercializados mundialmente para o consumo humano, sendo frescos ou processados (Joseph 2003), encontram-se o bigeye tuna (*Thunnus obesus*), yellow fin tuna - YFT (*T. albacares*) e skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Bril *et al.*, 2005). As análises populacionais em *T. obesus* chegam a uma conclusão de que duas populações bem definidas são encontradas em três oceanos, o clado I (β) do oceano Indo-Pacífico e o clado II (α) do oceano Atlântico (Alvarado – Bremer *et al* 1998; Chow *et al* 2000; Appleyard *et al.*, 2002; Durand *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Chiang *et al.*, 2006), enquanto que ainda é incerta a existência e quantidade de populações em *Katsuwonus pelamis*.

Identificar a estruturação populacional é importante no setor pesqueiro para uma melhor medida de conservação dos stocks (Carvalho e Hauser, 1994), estudos de genética de população (Excoffier *et al.*, 1992) e análises históricos demográficos (Fu, 1997; Rogers e Harpending, 1992; Slatkin e Hudson, 1991), genética da conservação (Lacy e Lindenmayer, 1995), entre outros. A conservação da variabilidade genética é um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo de extinção (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, 1995; Levy e Cassano, 1994). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes pode estimular a sobre-exploração, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e eliminar estoques locais (Kuusipalo, 1999). Devido a que muitos peixes apresentam características semelhantes e compartilham o mesmo nicho ecológico, isto levaria a pensar que suas populações possam ter a mesma distribuição geográfica, pelo qual este trabalho busca analisar a existência de alguma semelhança na identificação e distribuição das populações estes dois grandes tunídeos, principalmente capturados (*Thunnus obesus* e *Katsuwonus pelamis*) comparando o Oceano Pacífico (Peru) e o oceano Atlântico (Brasil).

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta das amostras

Amostras de *Katsuwonus pelamis* - Skipjack SKJ (53) e *Thunnus obesus* - Bigeye tuna BET (54) foram coletadas na costa do Brasil no oceano Atlântico e na costa do Peru no oceano Pacífico (Fig. 1 e Tabela 1). Os espécimes foram obtidos em desembarques pesqueiros, empresas atuneiras e mercado de peixes, uns 5 mm² de

tecidos foram retirados da nadadeira caudal o de musculo e guardados em etanol 96% armazenados a 4C ate seu processamento.

2.2. Extração do DNA e amplificação da Região controle

O DNA gnômico total foi extraído de amostras de tecidos usando uma placa de filtro de extração do DNA seguindo as instruções do fabricante (Ivanova *et al.*, 2006).

A PCR para a RC (1044 pb) foi feita em uma reação de 12,5 µl, contendo 1,25 µl de tampão 10 X PCR, 0.25µl de MgCl₂ (50 Mm), 0.2 µl dNTPs (2 mM), 0.5 µl de cada primer (5 mM), 0.1µl de 1.25 U de pht DNA Taq polimerase, e 1µl de DNA gnômico (200 ng). Os ciclos de PCR estiveram sob as seguintes condições: 94°C x 5 min, 30 ciclos de 94°C por 40 s, 54°C por 30s, 68°C por 1 min, e 72°C por 8 min, usando os iniciadores DLB 5'-AGC RYC GGT CTT GTA ATC CG-3'e DLA 5'-TCC YAC CCC TAA CTC CCA AAG-3' (presente estudo) para o D-loop. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose ao 1%. Todos os produtos da PCR foram sequenciados usando o BigDye sequencing kit cycle terminators (Applied Biosystems, California, USA) seguindo as instruções do fabricante e finalmente as sequencias foram analisadas usando o Analisador Genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, California, USA).

2.3. Análises dos dados

2.3.1 Alinhamento de sequencias

As sequencias do DNA obtidas foram alinhadas usando o programa Geneious v4.8.5 (Drummond *et al.*, 2009). Os alinhamentos foram otimizados usando o MUSCLE v3.6 (Edgar 2004) e visualizados para verificar. A saturação nucleotídica foi provada pela relação das transições e transversões usando o DAMBE v4.2.9 (Xia e Xie 2001).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbor joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987) usando o modelo de evolução de Kimura-two parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no MEGA, v5.2 (Tamura *et al* 2011). A sustentação estatística dentro dos nodos das árvores resultantes foi determinado por 1000 replicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

2.3.2 Analises populacional

Para uma melhor analises as duas espécies foram divididas em três grupos de acordo ao lugar de coleta. População do Peru (Pacífico), população do nordeste do Brasil e população do sudeste do Brasil (Atlântico). Sim embargo para *K. pelamis* também foi analisado clado a clado.

O Arlequin, v3.5.1 (Excoffier , 2010), DnaSP, v5.10 (Rozas *et al.*, 2010) e MEGA, v. 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) foram usados para calcular estatisticamente os valores tais como a composição nucleotídica, numero de sítios polimórficos (*S*), diversidade haplotípica (*Hd*; Nei, 1985), diversidade nucleotídica (π ; Lynch e Crease, 1990), media do numero das diferencias nucleotídicas par a par (*k*; Tajima, 1989) e a heterocigocis esperada por sitio (θ ; Watterson, 1975) foram calculadas para cada população geográfica (sudeste e nordeste do Brasil no Atlântico e o Peru no Pacífico). O efeito do isolamento por distancia na estrutura genética das populações foi estimado pela estatística par a par Φ_{ST} (Wright, 1951, 1965). A quantidade de variabilidade genética particionada dentro e entre populações foram testadas pela analises molecular de variância (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992). A significância das comparações populacionais par a par foi testada por 10,000 permutações. A organização das provas de AMOVA foi de uma maneira jerarquica e se utilizaram 1,000 permutações para construir a distribuição nula e para provar a significância dos componentes de variância (Guo e Thompson, 1992).

A análise de mismatch foi testada, o qual compara a distribuição das frequências par a par dos indivíduos os quais se diferenciam por o numero de nucleotídeos diferentes. Usualmente estes padrões de divergência par a par entre os haplótipos forma uma curva unimodal sugerindo a expansão populacional, sendo que as que formam uma curva multimodal sugerem que a população encontra-se em equilíbrio demográfico (Rogers e Harpending, 1992; Schneider e ExcoYer, 1999; Slatkin e Hudson, 1991). A valides da expansão populacional gradual foi testada com um bootstrap paramétrico de 1000 permutações. O modelo de expansão das populações súbitas foi testado usando o índice de Harpending's raggedness (Hrr, Harpending, 1994). Finalmente para testar as desviações de neutralidade empregamos os índices de Tajima's D (Tajima, 1989) e do FU'S Fs (Fu, 1997).

3. Resultados

3.1. Características moleculares

Um fragmento da região controle do mtDNA de aproximadamente 860 pb foi sequenciado em 107 amostras de BET e SKJ.

Para o BET, 96 sítios variáveis foram observados e 54 haplótipos (Tabela 2) foram definidos. Todos os haplótipos foram únicos para cada individuo. Entre as sequencias examinadas, o conteúdo das bases A/T são maiores do que o conteúdo das bases C/G (media: A= 28,8%, T = 32,1%, C= 15.6%, G= 23,4%), consistente com estudos prévios mostrando que o D-loop é uma região rica em A-T do genoma mitocondrial (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1987).

Para o SKJ, 91 sítios variáveis foram observados e 52 haplótipos (Tabela 2) foram definidos. A maioria dos haplótipos foram únicos com exceção de um haplótipo (com dois indivíduos). O conteúdo das bases A/T é maior do que C/G (média: T=32,3%, A=28,7%, C=16,0%, G=23%).

3.2. Padrões da estrutura populacional

Thunnus obesus

Na Fig. 2, o cladograma de *Thunnus obesus* revela dois clados, cada um com 27 amostras. O clado I com amostras do oceano Atlântico é fortemente suportado com um valor de bootstrap de 95%. Em contraste, com o clado II, medianamente sustentado com um bootstrap de 77% com amostras do oceano Pacífico com exceção de três amostras que pertenceram ao Brasil. Para a identificação das relações evolutivas entre os clados de BET foi construída uma rede de haplótipos (Fig.3). Na rede é possível identificar dois grupos separados por 19 passos mutacionais, sendo um composto exclusivamente por indivíduos do Atlântico e outro composto majoritariamente por indivíduos capturados no Pacífico além de 3 indivíduos provenientes do Atlântico.

Através dos valores de F_{st} par a par (Tabela 4) é possível verificar que as duas populações do Atlântico possuem forte estruturação populacional com a população do Pacífico não possuem estruturação entre elas. Através da AMOVA foi possível identificar que cerca de 24% da variação encontrada em *Thunnus obesus* é referente à variação entre grupos (considerando Pacífico como um grupo e Sudeste e Nordeste do Brasil como outro). O valor de F_{st} global foi 0,498 e significativo, o que condiz com os resultados obtidos na análise par a par e indica a presença de duas populações distintas em *Thunnus obesus* com os indivíduos analisados no presente estudo.

Nas análises de distribuição mismatch, realizadas independentemente para as duas agrupações encontradas (Atlântico, considerando a Nordeste e Sudeste do Brasil, e Pacífico) mostraram uma curva unimodal para a agrupação do Pacífico (Fig. 6) e multimodal para a agrupação do Atlântico (Fig. 7), os valores para o índice F_s de F_u foram negativos e significativos, enquanto os valores de D de Tajima, H_{rr} e SSD não apresentaram resultados significativos.

Em *Katsuwonus pelamis* (coletado no Peru, São Paulo, Espírito Santo e Natal) evidenciamos dois clados (Fig.4), o clado I sem uma forte sustentação de *bootstrap* (<50%) e o clado II fortemente estruturado (87%) com uma distância média intra e interpopulacional de 4.49% e 6.16% respectivamente (dados não mostrados) e sem uma correlação das amostras com o ponto de coleta das mesmas. Através da rede de haplótipos (Fig.5) também é possível identificar dois grupos com 10 passos mutacionais entre eles, porém sem uma correspondência clara com a distribuição geográfica dos pontos de coleta. Os valores para os índices de fixação Φ_{ST} par a par e Φ_{ST} global foram negativos e não significativos, porém o Φ_{ST} entre os clados (I e II) foi de 0.38 (Tabela 4) e estatisticamente significativo ($p < 0.05$). Nas análises de AMOVA 100% da variação encontrada está dentro das populações.

Considerando as três populações, independentemente, os valores para o índice F_s de F_u (Tabela 5) foram negativos e significativos no Sudeste do Atlântico e Pacífico e não significativo no Nordeste do Brasil, enquanto para o teste D de Tajima, todos os valores encontrados foram não significativos. Como não foi detectada estruturação populacional para esta espécie em relação ao ponto de coleta, novos valores de F_s de F_u , D de Tajima (dados não mostrados), bem como a distribuição mismatch e os valores de H_{rr} e SSD foram calculados agrupando todos os indivíduos. A distribuição mismatch foi unimodal (Fig. 8) e o valor de F_s de F_u foi negativo e significativo, porém tanto o valor de D de Tajima quanto os valores de H_{rr} e SSD foram não significativos.

4. Discussão

Thunnus obesus

Os valores de Φ_{ST} par a par e global encontrados no presente estudo indicam a presença de uma forte estruturação populacional entre os indivíduos do oceano Atlântico e oceano Pacífico em *Thunnus obesus* e a existência de um estoque único na

bacia Atlântica utilizando a região controle do DNA mitocondrial, bem como em estudos anteriores com a mesma espécie (Alvarado Bremer *et al.*, 1997, 1998; Chow *et al.*, 2000; Durand *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2008; Appleyard *et al.*, 2002; Grewe e Hampton 1998; Martines e Zardoya 2005; Gonzáles *et al.*, 2008). Finalmente hoje é aceito que a população do Pacífico é diferente da população do Atlântico e que um simples estoque é encontrado neste ultimo oceano (Duarte-Neto *et al.*, 2012).

A estruturação populacional entre os oceanos Atlântico e Indo-Pacífico (considerando os oceanos Índico e Pacífico) e a presença de um clado exclusivo no Oceano Atlântico também foi observada em outros estudos com *Thunnus obesus* (Alvarado Bremer *et al.*, 1998; Grewe e Hampton, 1998; Chow *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006), além de outras espécies de peixes marinhos, como em *Makaira nigricans* (Buonaccorsi *et al.*, 2001) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro *et al.*, 2008). Este padrão pode ser explicado por processos históricos que separaram a bacia Atlântica das outras bacias oceânicas, como o surgimento do Istmo do Panamá no Plioceno (Coates *et al.*, 1992) formando uma barreira à migração pelo lado oeste do oceano Atlântico e mais tarde no Pleistoceno com o aparecimento da ressurgência de Benguela (Shannon 1985).

O outro clado encontrado no presente estudo é composto em sua maioria por indivíduos do oceano Pacífico porém com a presença de alguns indivíduos capturados no oceano Atlântico. Este resultado pode indicar a migração unidirecional de indivíduos de *Thunnus obesus* do Pacífico para o Atlântico. Após o isolamento histórico causado pelo surgimento da ressurgência de Benguela é possível que tenha havido, e ainda aconteçam, contatos secundários entre a população desta bacia oceânica e a população do Pacífico. Os episódios de aquecimento da região da ressurgência de Benguela após as cinco últimas glaciações, constatados através de evidências fósseis (Peeters *et al.*, 2004), podem ter permitido este contato secundário entre bacias. Porém também há a

possibilidade da ocorrência de migração atual através da ressurgência de Benguela devido à transferência ocasional de águas quentes do Indo-Pacífico para o Atlântico através da região da retroflexão da Corrente das Agulhas (Peeters *et al.*, 2004, Sigman *et al.*, 2010). O contato secundário entre as populações das duas bacias oceânicas após as glaciações e atualmente, também é uma hipótese levantada para diversas espécies de peixes marinhos, como *Thunnus obesus* (Martínez *et al.*, 2006), *Makaira nigricans* (Buonaccorsi *et al.*, 2001) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro *et al.*, 2008) e tubarões *Sphyrna lewini* (Duncan *et al.*, 2006).

As análises das populações de *T. obesus* (Pacífico e Atlântico), demonstram que a população do Pacífico apresenta uma distribuição unimodal e com um valor de F_s de F_u negativo e significativo ($p < 0.05$), porém contradiz aos índices de D de Tajima, o qual foi negativo, mas não significativo nas análises de H_{rr} e SSD , as quais também não foram estatisticamente significativos, não sendo possível confirmar uma hipótese de expansão populacional, o contrário do encontrado por Martinez *et al.* (2006) onde os autores descrevem que todos estes índices foram significativos, analisando 64 indivíduos do Indo-Pacífico. Nossos valores não significativos poderiam ser devido ao baixo número de amostras que se tem para esta população (24 indivíduos). Por outro lado na população do Atlântico encontramos uma distribuição multimodal, com um índice de F_s de F_u negativo e significativo para os indivíduos do sudeste do Atlântico e positivo mas não significativo para os indivíduos do nordeste do Atlântico. Sendo que em ambos os casos os índices de D de Tajima, H_{rr} e SSD não se apresentam significativos. Martinez *et al.* (2006) analisando indivíduos de diferentes localidades do Atlântico (Azores, Canárias, Guiné e Canadá) confirmam uma expansão populacional para estas amostras, mas não analisam indivíduos do Atlântico Sudoeste. O que nos levaria a pensar que na atualidade esta população encontrasse estável.

Mesmo que exista uma separação populacional (no cladograma e na rede de haplótipos) não encontramos uma correlação entre os pontos de coleta e nem entre bacias oceânicas como descrito em estudos anteriores (Fujino e Kang, 1968; Fujino, 1970; Sharp 1978; Fujino *et al.*, 1981; Arge, 1981; Graves *et al.*, 1984; Elliot e Ward, 1995) que também encontraram pequenas diferenças nas frequências alélicas em um ou dois locis, entre amostras dos dois oceanos (Graves *et al.*, 1984). Isto contrasta com outras espécies que vivem nas regiões costeiras de ambos lados do canal do Panamá, as quais são geneticamente distintas (Vawter *et al.*, 1980).

Analisando as populações inicialmente propostas (sudeste e nordeste do Brasil e Peru), o índice de Φ_{ST} nos três agrupamentos revelou a falta de estruturação populacional (Tabela 4), o AMOVA mostra que existe maior variação dentro das populações do que entre elas (Tabela 3), e os três agrupamentos apresentam alta diversidade haplotípica (Tabela 4) que são características de grandes populações (Ward *et al.*, 1994). Mas analisando os clados I e II observamos uma forte estruturação populacional ($\Phi_{ST} = 0.38$) estatisticamente significativa, sem uma correlação geográfica. Uma explicação poderia ser baseada nas oscilações do nível do mar. Durante o Mioceno o nível do mar era geralmente alto, mas duas quedas no nível de 100 metros poderia ter acontecido entre 17 e 15 Ma (Haq *et al.*, 1987). Estudos geológicos recentes sugerem que a ponte de terra do Panamá poderia ter sido ainda mais antiga, com aproximadamente 23 a 25 Ma (Farris *et al.*, 2011; Montes *et al.*, 2012). Iturralde-Vinent e McPhee (1999), propõem a hipótese da GAARlandia (GAAR = Greater Antilles + Aves Ridge) sugerindo a formação de uma ponte de terra entre América do Sul e o centro da América central há aproximadamente 32 Ma, possibilitando assim a migração e posterior expansão de animais e peixes de água doce (Murphy e Collier,

2006; Chakrabarty, 2006; Hrbek *et al.*, 2007; Concheiro *et al.*, 2007; Ornelas-Garcia *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2011; Rícan *et al.*, 2013, Abe *et al.*, 2014). No ambiente marinho o efeito seria o contrario com o qual *K. pelamis* poderia ter sido isolada em duas populações em eventos que ocorreram entre de 32 e 15 Ma, tendo ficado restritas cada uma a um oceano, mas com o aumento do nível do mar, restaurou-se o fluxo entre ambas populações permitindo a mistura das duas novamente, porém com fechamento final do Istmo do Panamá há 3.2 Ma (Coates *et al.*, 1992) a migração entre o oceano Pacífico e o Atlântico foi perdida novamente e desde então ambas populações podem ser encontradas aos dois lados do Istmo. Sendo que o grande tamanho efetivo populacional de *K. pelamis* tem sido o principal responsável para manter a similaridade entre as populações do Atlântico e do Pacífico (Ely *et al.*, 2005) que atualmente encontram-se misturadas.

A distribuição unimodal do mismatch (Fig. 8) e um valor negativo e significativo para o índice F_s de F_u (Tabela 5), o que seria indicativo de uma expansão populacional recente contradiz aos índices D de Tajima, H_{rr} e SSD que não foram significativos, o que não corrobora a hipótese de expansão. Sugerindo que o tamanho efetivo desta espécie tem sido grande e estável por longos períodos de tempo evitando assim a diferenciação genética como o encontrado por Ely *et al.* (2005). Isto poderia ser confirmado pela elevada biomassa encontrada para esta espécie de aproximadamente cinco vezes maior do que o *T. albacares* e 300 vezes maior do que o atum azul e o peixe espada (Ely *et al.*, 2005) e pela elevada quantidade de toneladas capturadas por ano de 2.8 milhões no 2012 contra 1.3 milhões para o *T. albacares* (FAO, 2014).

5. Considerações finais

Segundo Ward *et al.* (1994) as espécies marinhas tendem a ter valores mais baixos de Φ_{ST} , como o observado no presente trabalho, quando comparadas a organismos de água doce ou com espécies anádromas.

A alta diversidade haplotípica e altos níveis de variação genética, como os observados em este trabalho, poderiam aumentar o potencial das populações em responder a seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004).

Por outro lado, elevados índices de variabilidade genética, para a região controle, tem sido observados em diversos peixes migradores de água doce e água salgada, explorados comercialmente, *Leporinus elongatus* (Martins *et al.*, 2003), *Pimelodus albicans* (Vergara *et al.*, 2008), *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009) e *Piaractus mesopotamicus* (Iervolino *et al.*, 2010), demonstrando que a atividade pesqueira, a qual é elevada todo ano, ainda não reduziu a variabilidade genética destas espécies. Mas isto não quer dizer que estas populações não estejam ameaçadas pela pesca, pois altos níveis de diversidade genética foram encontrados também em espécies sobre pescadas ou em plena exploração (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009; Batista e Alves-Gomes, 2006; Batista, 2010; So *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Passos, 2009; Huergo, 2009) um exemplo claro no caso do atum azul *Thunnus thynnus* (Carlsson *et al.*, 2006).

A diferenciação genética é resultado do isolamento reprodutivo, separação física e perda de migração das populações (Graves *et al.*, 1984), no caso de *Thunnus obesus* a estruturação populacional esta associada à barreira do Istmo do Panamá que tem diminuído o contato entre populações de ambos oceanos aumentando assim as

diferenças significativamente (Alvarado Bremer *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 2000) como o encontrado em outros grandes pelágicos como o peixe espada (Alvarado Bremer *et al.*, 1995; Rosel e Block 1996), marlin azul (Finnerty e Block, 1995) e o peixe vela (Graves e McDowell, 1994). Sendo a estruturação populacional em *K.pelamis* devida às oscilações do nível do mar (32 -15 Ma) entre América central e América do Sul (Haq *et al.*, 1987; Iturralde-Vinent e McPhee 1999; Farris *et al.*, 2011; Montes *et al.*, 2012) o que serviu como uma barreira para a migração, no ambiente marinho. Pelo qual rejeitamos a hipótese nula de panmixia nas espécies analisadas do oceano Pacífico e o Atlântico.

Finalmente em este trabalho não observamos correlação entre a distribuição das populações e a estreita relação que apresentam estes grandes atuns, estudos com marcadores que apresentem maior taxa de evolução são necessário para esclarecer melhor estes resultados.

6. Referências

As referências deste capítulo encontram-se no final da tese.

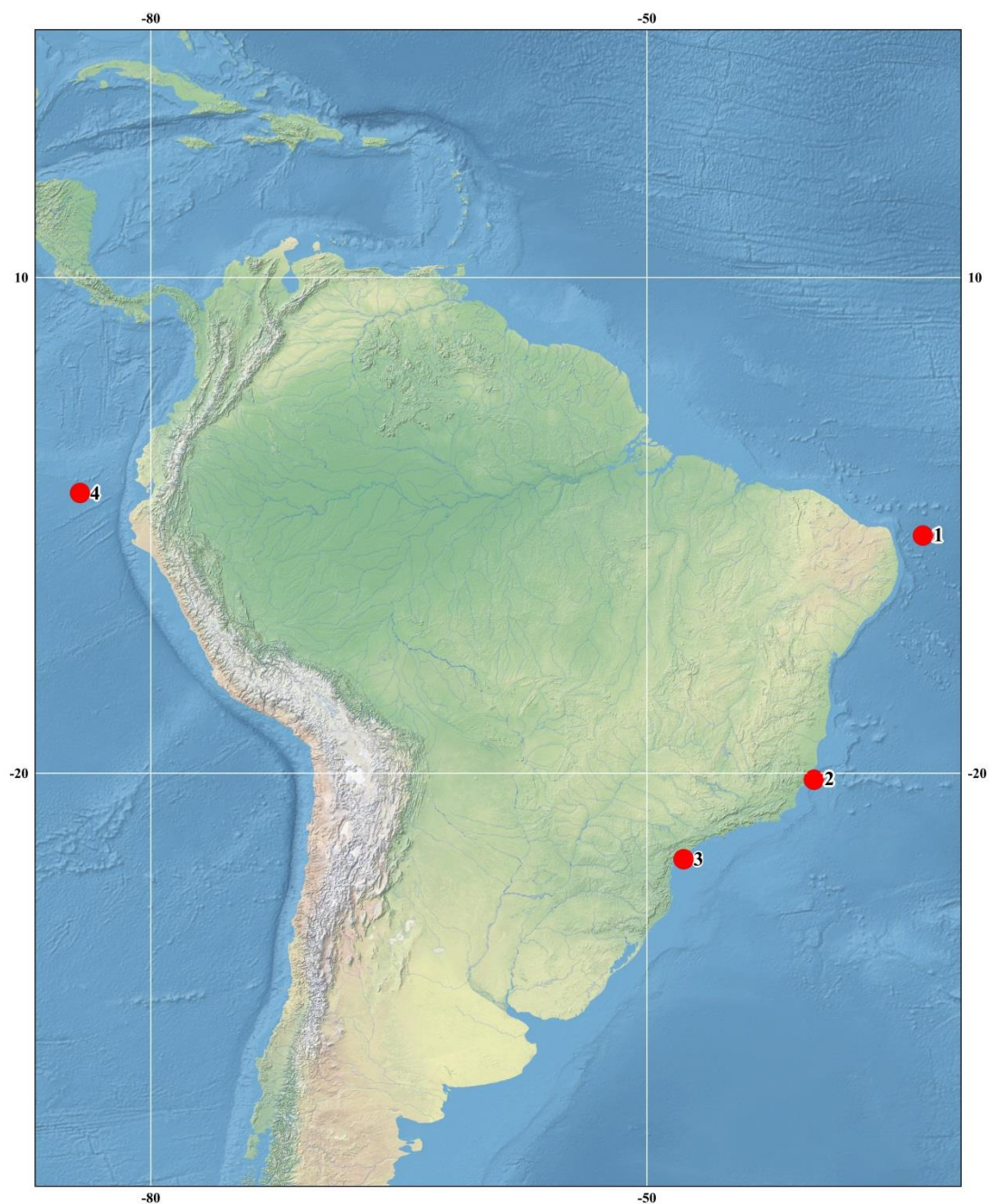


Fig 1. Mapa mostrando os pontos de coleta das amostras analisadas no presente estudo.

1. Natal, 2. Espírito Santo, 3. São Paulo e 4. Piura – Peru.

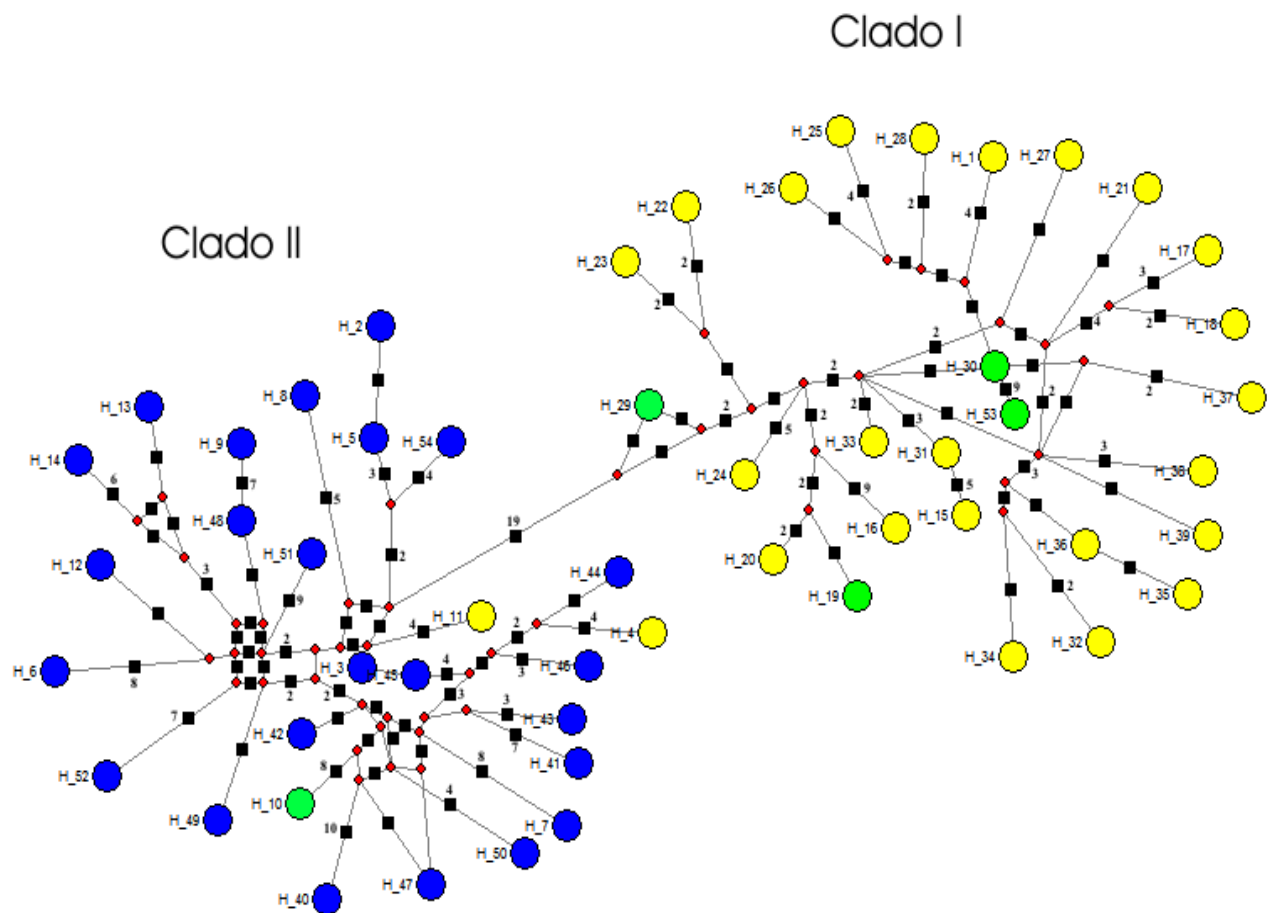


Fig. 3 Rede de haplótipos de *Thunnus obesus* (54 indivíduos e 54 haplótipos). Os haplótipos foram separados em três populações de acordo aos lugares de coleta, população do Sudeste do Brasil – Atlântico (amarelo), formada pelos indivíduos de São Paulo, a população do Nordeste (verde), formada pelos indivíduos Natal, e a população do Pacífico (azul) formada pelos indivíduos do Peru. Os haplótipos na cor vermelho, são considerados como haplótipos hipotéticos, que servem de conexão entre um haplótipo e outro. Os quadrados em preto representam o numero de mutações. O clado I formado por indivíduos do oceano Atlântico e o clado II formado por indivíduos maioritariamente do Pacífico. O tamanho dos haplótipos dependeu da quantidade de espécimes que o compartilharam.

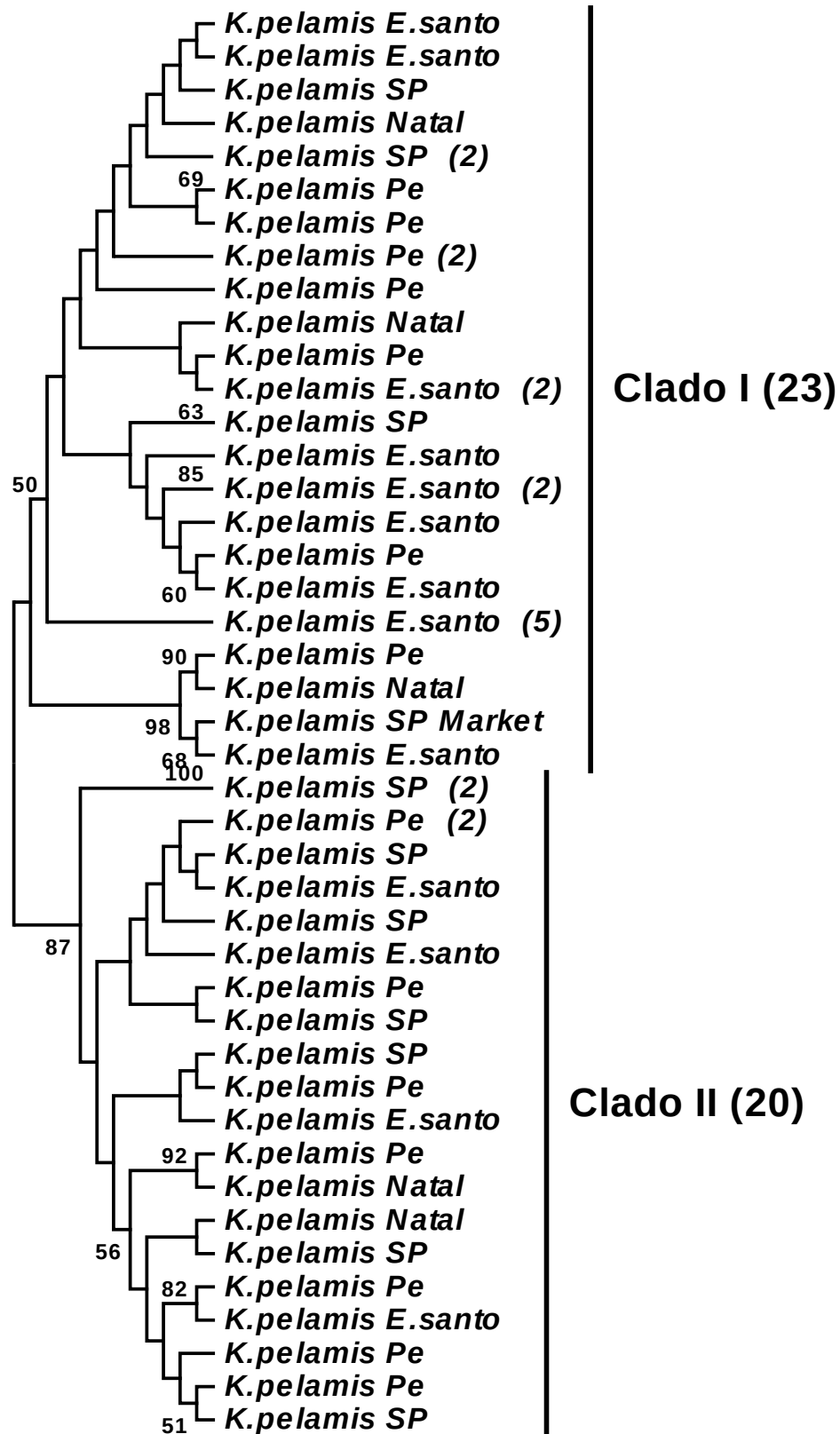


Fig. 4 Cladograma de *Katsuwonus pelamis* gerado pelo método de Neighbor joining e modelo de Kimura 2-parametros

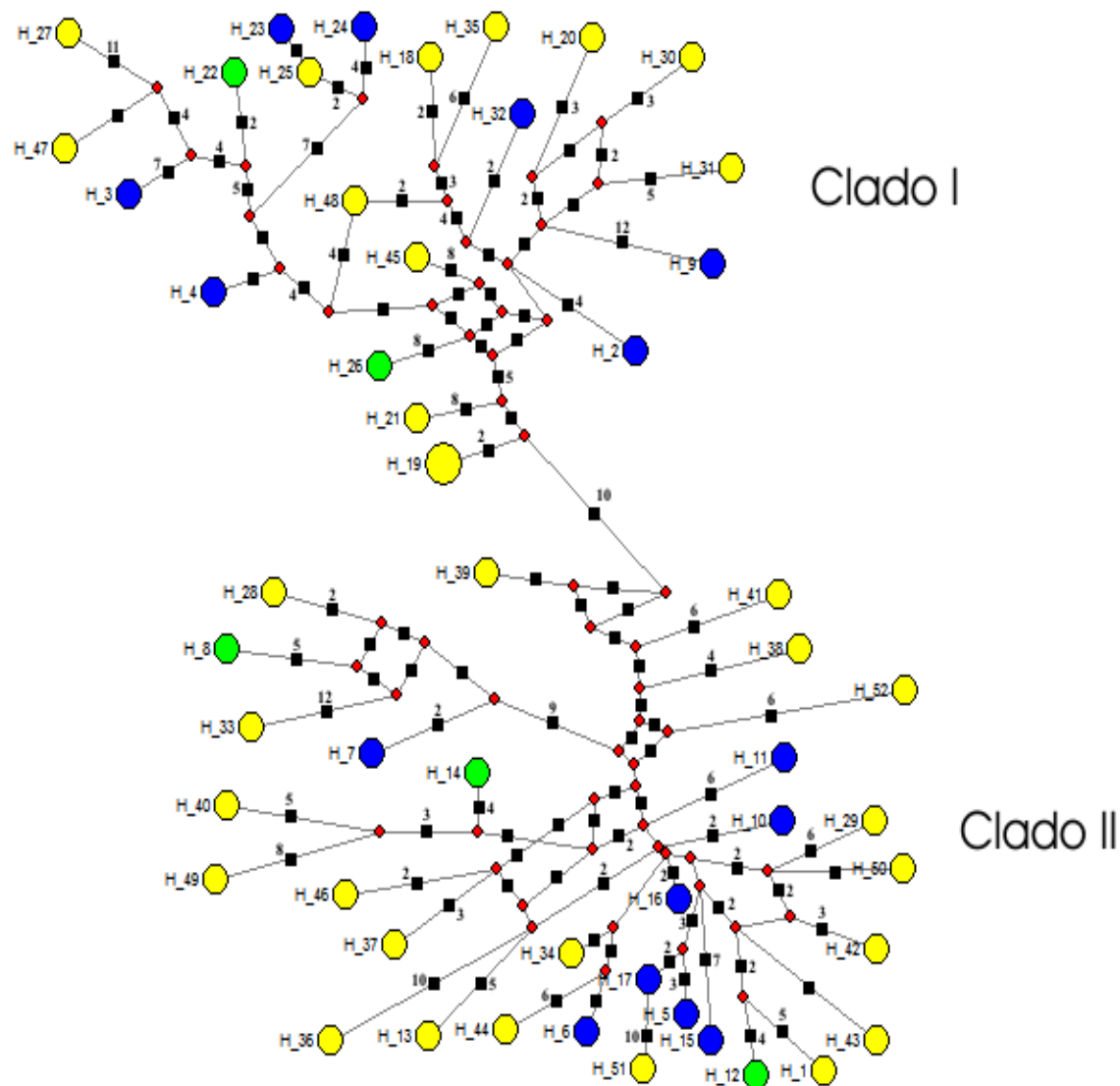


Fig.5 Rede de haplótipos de *Katsuwonus pelamis* (53 indivíduos e 52 haplótipos). Os haplótipos foram separados em três populações de acordo aos lugares de coleta, população do Sudeste do Brasil – Atlântico (amarelo), formada pelos indivíduos de São Paulo e Espírito Santo, a população do Nordeste (verde), formada pelos indivíduos Natal, e a população do Pacífico (azul) formada pelos indivíduos do Peru. Os haplótipos na cor vermelho, são considerados como haplótipos hipotéticos, que servem de conexão entre um haplótipo e outro. Os quadrados em preto representam o numero de mutações. O tamanho dos haplótipos dependeu da quantidade de espécimes que o compartilharam.

Fig.6 Distribuição de mismatch da população do Pacífico de *Thunnus obesus*

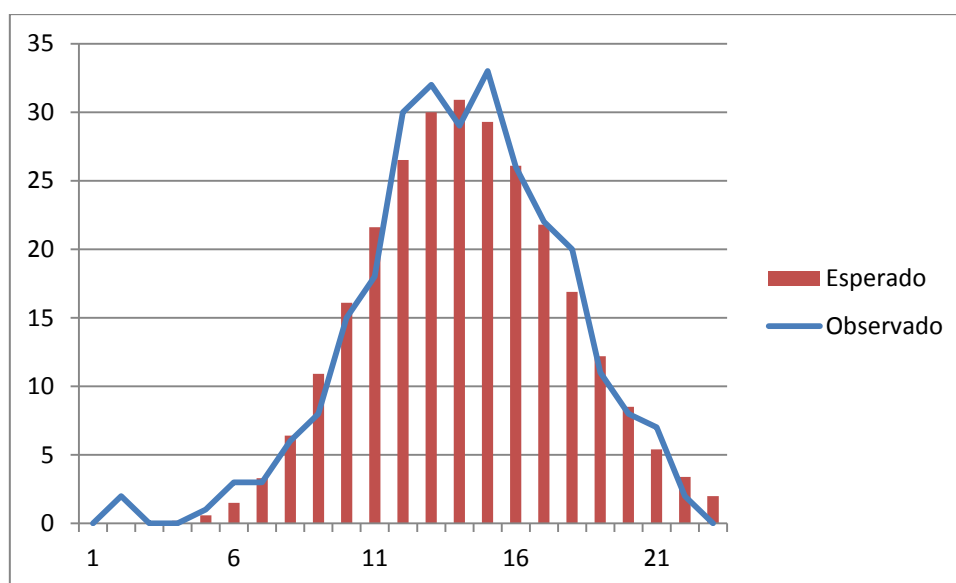


Fig. 7 Distribuição de mismatch da população do Atlântico de *Thunnus obesus*

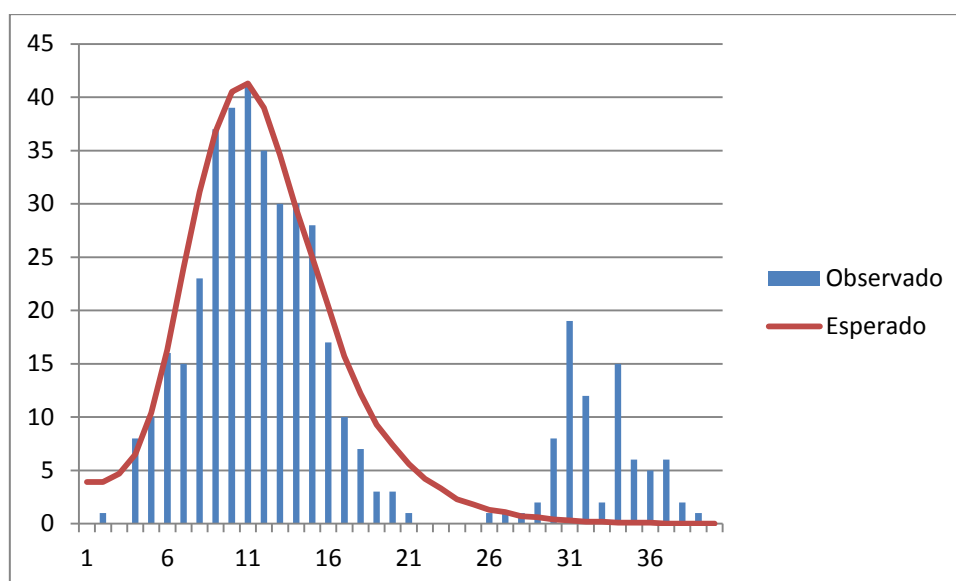


Fig. 8 Distribuição de mismatch da população total (Pacífico e Atlântico) de *Katsuwonus pelamis*

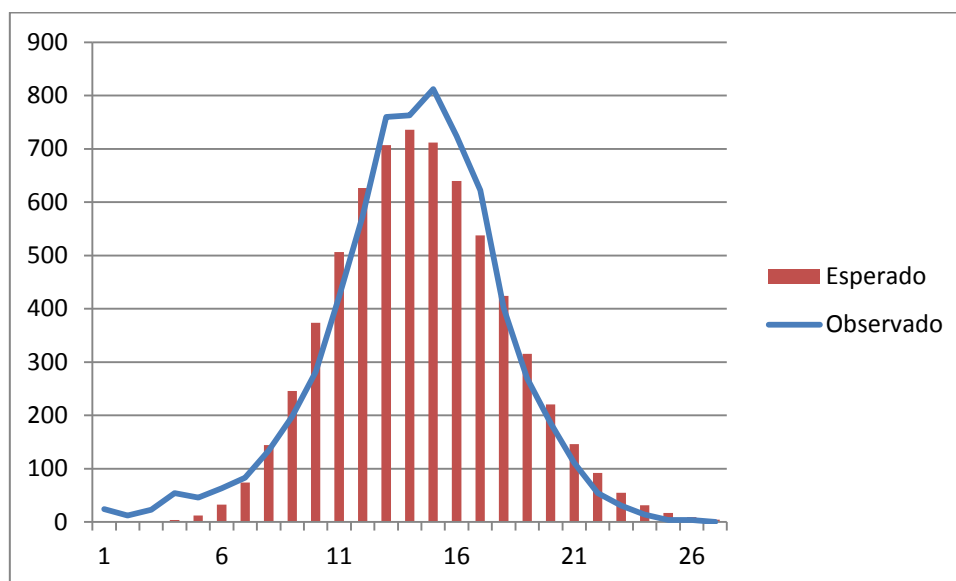


Tabela 1. Espécimes de *Thunnus obesus* e *Katsuwonus pelamis* coletados para este estudo. Br = Brasil; Pe= Peru.

Espécies	Numero de amostras	Localidade	Ponto no Mapa
<i>T.obesus</i>	25	São Paulo-Br	3
<i>T.obesus</i>	5	Natal-Br	1
<i>T.obesus</i>	24	Paíta-Pe	4
<i>K.pelamis</i>	13	São Paulo-Br	3
<i>K.pelamis</i>	5	Natal-Br	1
<i>K.pelamis</i>	19	E.santo-Br	2
<i>K.pelamis</i>	16	Paíta-Pe	4

Tabela 2: Numero de amostras (n); Diversidade nucleotídica (π); Diversidade haplotípica (h); Numero de haplótipos (nh) dos atuns

Grupos	n	nh	h	π
<i>Thunnus obesus</i>				
1 Sudeste do Brasil	25	25	1.000 +/- 0.011	0.027 +/- 0.014
2 Nordeste do Brasil	5	5	1.000 +/- 0.127	0.034 +/- 0.021
3 Peru	24	24	1.000 +/- 0.012	0.025 +/- 0.013
<i>Katsuwonus pelamis</i>				
1 Sudeste do Brasil	32	31	0.998 +/- 0.009	0.209 +/- 0.105
2 Nordeste do Brasil	5	5	1.000 +/- 0.127	0.233 +/- 0.146
3 Peru	16	16	1.000 +/- 0.022	0.213 +/- 0.112

Tabela 3: Análise de variância molecular (AMOVA) e Φ ST entre grupos de atuns usando o D-loop. * P<0.05

Espécie	Fonte da variação	Soma de quadrados	Componentes de variação	% de variação	Φ ST
<i>T. obesus</i>	Entre grupos	231.512	8.262	24.894	Φ ST 0.498
	Entre populações dentro dos grupos	9.440	0.120	1.004	
	Dentro das populações	430.252	8.436	74.102	
<i>K. pelamis</i>	Entre grupos	9.818	0.309	3.06	Φ ST -0.006
	Entre populações dentro dos grupos	6.993	-0.369	-3.64	
	Dentro das populações	509.019	10.180	100.59	

Tabela 4: Valor do Φ_{ST} par a par entre grupos de atuns usando o D-loop. * $P < 0.05$.

<i>Thunnus obesus</i>	1	2	3
1. Nordeste do Brasil	-		
2. Sudeste do Brasil	0.007	-	
3. Peru	0.440*	0.515*	-
<i>Katsuwonus pelamis</i>	1	2	3
1. Nordeste do Brasil	-		
2. Sudeste do Brasil	-0.037	-	
3. Peru	-0.036	-0.001	-
1. Clado I			
2. Clado II	0.383*		

Tabela 5: Teste de neutralidade (Tajima's D e Fu's FS) para grupos de atuns usando o D-loop. * $P < 0.05$.

Grupos		D-loop		
<i>Thunnus obesus</i>		Tajima's D	Fu's Fs	Harpending's raggedness H _r
1	Sudeste do Brasil	-1.034	-10.00*	0.0064
2	Nordeste do Brasil	-0.335	0.605	0.0068
3	Peru	-0.535	-12.621*	0.0058
				0.0011
<i>Katsuwonus pelamis</i>				
1	Sudeste do Brasil	-0.060	-13.936*	
2	Nordeste do Brasil	0.456	0.653	0.0044
3	Peru	0.197	-4.759*	0.0015

Referências

- Abe K, Mariguela TC, Avelino G, Foresti F, Oliveira C. 2014. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary Biology* 14: 152
- Aires-da-Silva, A. e Maunder, M.N. 2011. Status of bigeye tuna in the eastern Pacific Ocean and outlook for the future. Inter-American Tropical Tuna Commission, *Estoque Assessment Reports* 11.
- Allcock, A.L., I. Barratt, M. Eléaumei, K. Linse, M. D. Norman, P. J. Smith, D. Steinke, D. Stevens., Strugnell, J.M. 2011. Cryptic speciation and the circumpolarity debate: A case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. *Deep-Sea Research II*, 58: 242-249.
- Alonso, R., Crawford, A.J. & Bermingham, E. 2011. Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae:Peltophryne) based on mitochondrial and nuclear genes. *Journal of Biogeography*, doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02594.x.
- Alvarado Bremer, J.R., Mejuto, J., Baker, A.J., 1995. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius* L.) populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1720 - 1732.
- Alvarado Bremer, J.R., Mejuto, J., Greig, T.W., Ely, B., 1996. Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197, 295-310.
- Alvarado Bremer JR, Naseri I, Ely B. 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology* 50(3); 540-554.
- Alvarado Bremer JR, Zhang L, Bulak JS, Ely B. 1998. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for discrimination of mitochondrial DNA from Florida and Northern subspecies of largemouth bass. *Transactions of American Fisheries Society*, 127, 507-511.
- Alvarado Bremer JR, Stequert B, Roberson NW, Ely B. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Marine Biology* 132: 547-557
- Alvarado Bremer J. R., I. Naseri, and B. Ely. 1999. A provisional study of Atlantic northern bluefin tuna populations. SCRS/98/78. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, GFCM/ICCAT. Genoa, Italy. Coll Vol Sci Pap, 49(1); 127-129.
- Alvarado Bremer J. R., Viñas J., Mejuto J., Ely B., Pla C. 2005. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional

phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005b;36:169-187.

Appleyard, S.A., Renwick, J.M.; Mather, P.B. 2001. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. *Aquac. Res.*, Oxford, v.32, p. 287-296

Appleyard SA, Ward RD, Grewe PM. 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of Fish Biology*, 60, 767-770.

April J, Mayden RL, Hanner RH, Bernatchez L. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proc Nat Acad Sci USA*, in press

Aquadro CF, Greenberg BD. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103, 287-312.

Argue AW. 1981. Report of the second skipjack survey and assessment program workshop to review results from genetic analysis of skipjack blood samples. South Pacific Commission, Skipjack Survey and Assessment Programme Technical report N6. Pp 39

Attardi G (1995) Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93, 93-143.

Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman e Hall.

Avise JC. 1998. The history and purview of phylogeographic: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371- 379.

Batista, JS and Alves-Gomez, JA. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish. *Genetic and Molecular Research*. 5 (4): 723-740.

Batista,JS. 2010. Caracterizacao genetica da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau,1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazonia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatelites: subsidios para conservacao e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus: [s.n.], 2010.Tese de doutorado. INPA. Manaus.

Becker S, Hanner R, Steinke D. 2011. Five years FISH-BOL: Brief status report. *Mitochondrial DNA* 22(Suppl 1):3-9

Belmonte A, Ortega A, de la Gándara F. 2007. Cultivo de túnidos Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo (España) 539-546.

Bertrand A, Bard FX, Josse E. 2002. Tuna food habits related to the micronekton distribution in French Polynesia. *Marine Biology*, 140: 1023-1037.

Bermingham E, Martin AP. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, Oxford, 7(4), 499-517.

Blanco M, Pérez-Martín RI, Sotelo CG. 2008. Identification of shark species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9868 – 9874.

Block BA, Finnerty JR, Stewart AF, Gidd J. 1993. Evolution of endothermy in fish: Mapping physiological traits on a molecular phylogeny. *Science*, 260:210–214.

Block BA, Dewar H, Blackwell SB, Williams TD, Prince ED, Farwell CJ, Boustany A, Teo SL, Seitz A, Walli A, Fudge D. 2001. Migratory movements, depth preferences and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science*, 293: 1310–1314.

Boehm JT, Woodall L, Teske PR, Louries SA, Baldwin C, Waldman J, Hickerson M. 2013. Marine dispersal and barriers drive Atlantic seahorse diversification. *Journal of Biogeography*. 40 (10): 1839 - 1849.

Bril RW, Bigelow KA, Musyl MK, Fritsches KA, Warrant EJ. 2005. Bigeye tuna behaviors and physiology and their relevance to stocks assessments and fishery biology. *ICCAT*, v. 57, n. 2: 141-161.

Brown GG, Gadalet G, Pepe G, Saccone C, Sbisà E. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192:503-511.

Buonaccorsi VP, MsDowell JR, Graves JE. 2001. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology* 10: 1179- 1196.

Buhay, J.E. 2009. ‘COI-like’ sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *J. Crustacean Biol.* 29:96-110.

Cann PL, Brown WM and Wilson AC. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106:479-499.

Camhi MS. 1998. Sharks and their relatives. *Ecology and Conservation*. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission 20.

Campton DE. 1987. Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In: Ryman N, Utter FU (eds) *Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp 161-192.

Cardoso YP, Montoya-Burgos JI. 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.

- Carlsson J, McDowell JR, Diaz-Jaimes P et al. 2004. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13: 3345–3356.
- Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43, 53-73.
- Carvalho GR, Hauser L. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 326-350.
- Carvalho-Filho A. 1999. Peixes: costa brasileira. São Paulo, Melro. 320 p
- Catanese G., Manchado M., Infante C. 2010. Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species. *Gene* 452: 35 - 43
- Chakrabarty P. 2006. Systematics and historical biogeography of Greater Antillean Cichlidae. *Mol Phyl Evol.* 39:619–627.
- Chiang H.C., Chien-Chung H., Cho-Chen Wu G., Shui-Kai C., Hsi-Yuan Y. 2008. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research* 90: 305 - 312
- Chow, S., Kishino, H. 1995. Phylogenetic Relationships Between Tuna Species of the Genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): Inconsistent Implications from Morphology, Nuclear and Mitochondrial Genomes. *Journal Molecular Evolution* 41:741-748
- Chow S, Ushiyama H. 1995. Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Marine Biology*. 123, 39-45.
- Chow S, Okamoto H, Miyabe N, Hiramatsu K, Barut N. 2000. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Molecular Ecology*, 9, 221–227.
- Chow, F.K., A.P. Weigel, R.L. Street, M.W. Rotach, and M. Xue 2006: High-resolution large-eddy simulations of flow in a steep Alpine valley. Part I: Methodology, verification, and sensitivity studies. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 45, 63–86.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK, Shivji, M.S. 2006. Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin
- Coates AG, Jackson JBC, Collins LS, Cronin TM, Dowsett HJ, Bybell LM, Jung P, Obando JA. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: the near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin*, 104, 814–828.
- Concheiro-Perez GA, Rican O, Orti G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya R. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Mol Phyl Evol* 43:91–110.

- Collette B.B., Reeb, C., Block, B. 2001. Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiology* 19: 1-33
- Collette B.B., Chao, L.N., 1975. Systematics and morphology of the bonitos (Sarda) and their relatives (Scombridae, sardini). *Fish. Bull.* 73, 515–625
- Collette BB. 1995. Scombridae, atunes, bacoretas, bonitos, caballas, estorninos, melva, etc: Guia FAO para identificación de especies para los fines de la pesca. *FAO*, 125 (2), 137.
- Collette BB. 1979. Adaptations and systematics of the mackerels and tunas. In G. D. Sharp and A. E. Dizon (eds.), *The physiological ecology of tunas*, pp. 7-39, Academic Press, New York.
- Collette BB. 1999. Mackerels, molecules, and morphology. *Proc. 5th Indo-Pacific Fish. Conf., Nouméa, 1997, Soc. Fr. Ichtyol.*, pp: 149 – 164.
- Collette BB, Russo JL. 1985. Interrelationships of the Spanish mackerels (Pisces: Scombridae: *Scomberomorus*) and their copepod parasites. *Cladistics* 1(2),141-158.
- Collette BB, Reeb C, Block B. 2001. Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiology* 19, 1-33.
- Collins RA, Armstrong KF, Meier R, Yi Y, Brown SDJ, et al. 2012. Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade. *PLoS ONE* 7(1): e28381. doi:10.1371/journal.pone.0028381
- Cortey M, Pla C, Garcia-Marin JC. 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 831-844.
- Dammannagoda, S.T., Hurwood, D.A., Mather, P.B. 2008. Evidence for fine geographical scale heterogeneity in gene frequencies in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the north Indian Ocean around Sri Lanka - *Journal of Fisheries Research*. 90. 147-157.
- Dasmahapatra, K. K. & Mallet, J. 2006 DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97, 254-255.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415
- De Salle R, Egan MG, Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 , 1905 -1916.
- De Salle R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology*, 20, 1545 -1547.

- Desse J, Desse-Berset N. 1994. Stratégies de pêche au 8ème millénaire : les poissons de Cap Andreas Kastros (Chypre). In: Le Brun A. (eds.); Fouilles récentes à Khirokitia . pp. 335-360. Editions Recherche sur Civilisations, Paris
- De Queiroz K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 6600–6607.
- Dodson JJ, Tremblay S, Colombani F, Carscadden JE, 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.
- Doumenge F. 1998. L’histoire des pêches thonieres. *ICCAT Scientific Papers*, 50, 753–802.
- Dosay-Akbulut M. 2008. The phylogenetic relationship within the genus *Carcharhinus*. *Comptes Rendues Biologies*, 331, 500-509.
- Duarte Neto PJ, Higa FM, Lessa RPT. 2012. Age estimation and growth of bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Teleostei: Scombridae) in the southwestern Atlantic. *Neotropical Ichthyology*, 10, 26-32.
- Dunn KA, Mcearchran JD, Honeycutt RL. 2003. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27, 259-270.
- Duncan KM, Martin APB, Bowen W, De Couet HG. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239–2251.
- Durand JD, Collet A, Chow S, Guinand B, Borsa P. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA markers indicate unidirectional gene flow of Indo-Pacific to Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations, and their admixture off southern Africa. *Marine Biology*, 147, 313-322.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 5: 113.
- Elliott, N.G., Ward, R.D. 1995. Genetic relationships of eight species of Pacific tunas (Teleostei, Scombridae) inferred from allozyme analysis. *Mar Freshwat Res* 46:(in press)
- Ely B, Viñas J, Alvarado-Bremer JR, Donna Black D, Lucas L, Covello K, Labrie AV, Thelen E. 2005. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *BMC Evolutionary Biology*, 5, 19.
- Environmental Studies (CERMES) ES 500 Project Reports, University of the West Indies, Cave Hill Campus, Barbados. Available, upon request, from the second author (AMCJ).

Eschmeyer, W. N. (ed.). 2014. Catalog of fishes: genera, species, references. Electronic version accessed 23 July 2014.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.

Falk TM, Teugels GG, Abban EK, 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27, 81-92

Farias IP, Ortí, G., Sampaio I, Shneider H, Meyer A. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 89-103.

Farris DW, Jaramillo C, Bayona G, Restrepo-Moreno SA, Montes C, Cardona A, Mora A, Speakman RJ, Glascock MD, Valencia V. 2011. Fracturing of the Panamanian Isthmus during initial collision with South America. *Geology* 39: 1007-1010.

Farrugio H. 1981. Exploitation et dynamique des populations de thon rouge, *Thunnus thynnus* (Linné 1758), Atlanto - Méditerranéennes. *Montpellier: Université des Sciences et Techniques du Languedoc*, 266.

Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV. 2002. The breeding biology of lemon sharks at a tropical nursery lagoon. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, 1655-1661.

Ferris SD, Berg WJ. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. In: Ryman N, Utter FM (eds.). *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle: University of Washington Press, Seattle, USA.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. *Evolution*, 39, 783-791.

Finnerty JR, Block BA. 1992. Direct sequencing of mitochondrial DNA detects highly divergent haplotypes in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol Mar Biol Biotech* 1:206-214.

Finnerty, J.R., Block, B.A. 1995. Evolution of cytochrome b in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into billfish (Istiophoridae and Xiphiidae) relationships. *Fish Bull* 93:78-96

Fonteles-Filho AA. 1988. Sinopse de informações sobre a cavala, *Scomberomorus cavala* (Cuvier) e a serra, *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo & Zvala-Camin

(Pisces: Scombridae), no estado do Ceará, Brasil. *Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará*, 27, 21-48.

Fonteles-Filho AA. 1989. Recursos pesqueiros. Biologia e dinâmica populacional. Fortaleza, Imprensa Oficial do Ceará, 296p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2008. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.

Formiga-Aquino, K. 2004. Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, 73 pp.

Frézal, L., Leblois, R., 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 727-736.

Fu, Y.X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147: 915-925.

Fujino K. 1970. Immunological and biochemical genetics of tuna. *Transactions of the American Fisheries Society*. 99: 152 – 178.

Fujino K, Kang T. 1968. Transferrin groups of tunas. *Genetics*. 59:79-91

Fujino, K., Sasaki, K., Okumura, S. 1981. Genetic Diversity of Skipjack Tuna in the Atlantic, Indian, and Pacific Oceans. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47, 215-222.

Graves, J.E., McDowell, J.R. 1994. Genetic analysis of striped marlin *Tetrapturus audax* population structure in the Pacific Ocean. *Can J Fish Aquat Sci* 51:1762–1768.

Gerlach G, Schardt U, Eckmann R, Meyer A. 2001. Kin-structured subpopulations in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Heredity*, 86, 213 –221

Graves, J. E. and J. R. McDowell. 1995. Inter-ocean genetic divergence of istiophorid billfishes. *Mar. Biol.* 122: 193-204

Gold JR, Jobity AMC, Saillant E, Renshaw MA. 2010. Population structure of carite (*Scomberomorus brasiliensis*) in waters offshore of Trinidad and northern Venezuela. *Fisheries research*, 103, 30–39.

Graves JE, McDowell JR. 2003. Stock structure of the worlds Istio-phorid billfishes; a genetic perspective. *Marine Freshwater Research*. 54: 287 -289

Gonzalez E., Beerli P., Zardoya R. 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). *BMC Evolutionary Biology*

Grewe PM, Hampton J. 1998. An assessment of the bigeye (*Thunnus obesus*) population structure in the Pacific Ocean, based on mitochondrial DNA and DNA

microsatellite analysis. Joint Institute for Marine and Atmospheric Research contribution 98-320. 1000 Pope Rd, Honolulu, HI, 96822. 29 p.

Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R, Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, 11, 1885–1898.

Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48: 361- 372

Haq BU, Hardenbol J, Vail PR. 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* 235:1156–1167.

Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79, 413-425.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp. Ser*, 41, 95–98.

Hazin FHV, Travassos PE . 2007. A Pesca Oceânica no Século 21. *Ver. Bras. Eng. Pesca, Pernambuco* 2(1), 60-75.

Hazin HG, Hazin F, Travassos P, Carvalho FC, Erzin K . 2007. i standardization of swordfish CPUE series caught by Brazilian longliners in the Atlantic Ocean, by GLM, using the targeting strategy inferred by cluster analysis. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 60(6): 2039-2047.

Hazin FHV, Viana DL, Pinheiro D, Fischer A, Macena B, Veras D, Oliveira P, Carvalho F, Vaske T, Branco I . 2009. [in]; Viana, D. L., Hazin, F. H. V. and Carvalho, M. A. (Orgs.) O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de estação científica. *Brasília: SECIRM*. 226 - 233.

Heist EJ, Gold J.R 1999. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 1, 182-186.

Heist EJ. 2005. Genetics: stock identification. In: Musick JA, Bonfil R (eds) *Management techniques for elasmobranch fisheries*. FAO Fish Tech Pap 474. *United Nations Food and Agriculture Organization, Rome*, p 62–75

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 313–321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: S596–S599.

Hebert PDN and Ryan Gregory. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5):852–859, 2005

Hebert PDN, deWaard JR, Landry J-F. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, 6, 359-362.

Hickerson, M.J., Meyer, C., Moritz, C., 2006b. DNA-Barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Syst. Biol.* 55, 729-739.

Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer EA. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. Pp. 321-381. In: Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B (Eds.). *Molecular Systematics 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts*, 655 pp.

Hoarau G, Rijnsdorp AD, Van Der Veer HW, Stam WT, Olsen JL. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology*, 11, 1165-1176.

Hodgkinson-Clarke F. 1990. The carite (*Scomberomorus brasiliensis*) fishery of South Trinidad: a comparison of catch rates, catch composition, use and operations of the monofilament and multifilament gillnets. Centre for Resource Management and

Hrbek T, Seckinger J, Meyer A. 2007. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Mol Phyl Evol* 43:986–998.

Hsieh CH, Reiss C, Watson W, Allen MJ, Hunter JR, Lea RN, Rosenblatt RH, Smith PE, Sugihara G. 2005. A comparison of long-term trends and variability in populations of larvae of exploited and unexploited fishes in the Southern California region: a community approach. *Progress in Oceanography*, 67, 160–185.

Holmes BH, Steinke D, Ward RD. 2009. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fish Res* 95:280–288

Huergo, G.M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazonia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 114 pp.

Iervolino F, Resende EK and Hilsdorf. 2010. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fish Res* 101:27-31

Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, Inumaru S, Kamtsu M and Mukoyama H. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of the equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 25:215-221

Iturralde-Vinent MA, MacPhee RDE. 1999. Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. *Bull Amer Mus Nat Hist.* 238:1–95.

Ivanova NV, De Waard JR, Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol Ecol Notes* 6:998-1002

Jesus J, Harris DJ, Brehm A. 2005. Phylogeography of *Mabuya maculilabris* (Reptilia) from São Tomé Island (Gulf of Guinea) inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 37, 503-510.

Johnson NK, Cicero C. 2002. The role of ecological diversification in sibling speciation of Empidonax flycatchers (Tyrannidae): Multigene evidence from mtDNA. *Mol Ecol* 11: 2065-2081.

Joseph J .2003. Managing fishing capacity in the world tuna fleet. *FAO Fisheries Circular* 982. Rome.

Kang J, Li X, Zhou R, Li L, Zheng G, Zhao H. 2011. Genetic diversity and differentiation of four goat lineages based on analysis of complete mtDNA d-loop. *Front Agric China* 5(1): 87-93.

Kalinowski ST. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genetics* 5: 539-543.

Kartavtsev YP, Lee JS. 2006. Analysis of Nucleotide Diversity at the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase 1 Genes at the Population, Species, and Genus Levels. *Russian Journal of Genetics*, 42(4): 341-362

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Keeny DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic. *Molecular Ecology*, 14 (7), 1911-1923.

Khanshour AM. e Cothran EG. 2013. Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among Arabian horse populations using whole mitochondrial DNA D-loop sequencing. *BMC Genetics*, 14:83

Kimura M, Dec. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* 16 (2), 111-120.

Köhler G, Ponce M, Batista A. 2007. A new species of worm salamander (genus *Oedipina*) from Fortuna, western central Panama (Amphibia, Caudata, Plethodontidae). *Senckenbergiana Biologica*, 87, 213-217.

Kotoulas, G., A. Magoulas, N. Tsimenides, and E. Zouros. 1995. Marked mitochondrial dNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mol. Ecol.* 4: 473-481.

- 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.
- Koskinen MT, Nilsson J, Veselov J, Potukin AG, Ranta E, Primmer CR. 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity*, 88, 391-401.
- 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
- Kunal S. P., Kumar G., Menezes M. R., Meena R. M. 2013. Mitochondrial DNA analysis reveals three estocques of yellowfin tuna *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) in Indian waters. *Conservation Genetics*, vol.14(1): 205-213
- Lacy, R.C., Lindenmayer, D.B. 1995. A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae, Marsupialia) in south-eastern Australia. 2. Loss of genetic variability within and between subpopulations. *Biology of Conservation*, 73: 131-142
- Laikre L, Miller L, Palmé A, Palm S, Kapuscinski AR, Thoresson G, Ryman N. 2005. Spatial genetic structure of northern pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1955–1964.
- Lakra WS, Verma MS, Goswami M et al. 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 11, 60-71.
- Lassen S. 1989. Manual de prácticas de Refrigeración en buques atuneros. California Fish Cannery Association, Terminal Island, California USA. 135 p.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D et al. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences*, 105, 2923-2928.
- Leaché AD, Mulcahy DG. . 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.
- Lessa RPT. 1986. Contribuição ao conhecimento da biologia de *Carcharhnus porosus* Ranzani, 1839 (Pisces, Chondrichtyes) das reentrâncias maranhenses. *Acta Amazônica*, 16/17, 73-86.
- Levy JA, Cassano VPF. 1994. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107(4), 515-517.

- Lewin B. 1994. Genes V. Oxford University Press Inc., New York.
- Li M, Wei F, Goossens B, Feng Z. 2005. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 36, 78-89.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy. *Trends Ecology Evolution*, 18, 65–66.
- Lynch M, Crease TJ. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
- Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, Kuehn R. 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetic Evolution*, 31, 1064-1083.
- Ludwig A, May B, Debus L, Jenneckens I. 2000. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 156, 1933-1947.
- Mães GE, Pujolar JM, Raeymaekers JAM, Dannewitz J, Volckaert FAM. 2006. Microsatellites conservation and Bayesian individual assignment in four *Anguilla* species. *Marine Ecology Progress Series*, 391, 251-261
- Mabragana E, Dias de Astarloa JM, Hanner R, Zhang J, Gonza'les-Castro M. 2011. DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS ONE*, 6, e28655
- Machado VN. 2009. Análise da variabilidade genética da curimatã, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Programa de Pos-graduação em Ciencias Pesqueiras nos Tropicós – PPG – CIPET. Universidade Federal do Amazonas 65pp.
- Machida RJ, Tsuda A. 2010. Dissimilarity of Species and Forms of Planktonic *Neocalanus Copepods* Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. *PLoS ONE* 5(4): e10278.
- Mather FJ, Mason JMJr, Jones A. 1995. Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna, Pages 165 pp. Miami, NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-370.
- Martins, C., A. P. Wasko, C. Oliveira & F. Foresti. 2003. Mitochondrial DNA variation in wild population of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 33-38.

- Martinez, P. e Zardoya R. 2005. Genetic Structure of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) in the Atlantic Ocean. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 57(1): 195-205.
- Martínez P, Gonzalez EG, Castilho R, Zardoya R. 2006. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Mol Phylogenet Evol.* 39, 404-416.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, 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, M.R., Kumar, G., Kunal, S.P. 2012: Population genetic structure of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* from the Indian coast using sequence analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. *J. Fish Biol.*, 80: 2198-2212.
- Meyer CP, Geller JB, Paulay G. 2005. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution* 59: 113-125.
- 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*.
- Miller M. A., W. Pfeiffer, and T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1-8
- Mitchell A. 2008 DNA barcoding demystified. *Aust. J. Entomol.* 47, 169-173.
- Montes C, Cardona A, McFadden R, Morón SE, Silva CA, Restrepo-Moreno S, Ramírez DA, Hoyos N, Wilson J, Farris D, Bayona GA, Jaramillo CA, Valencia V, Bryan J, Flores JA. 2012. Evidence for middle Eocene and younger land emergence in Central Panama: Implications for Isthmus closure. *Geol Soc Am Bull.* 124:780–799.
- Moritz C, Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biol* 2(10), e354.
- Murphy WJ, Collier GE: Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fi sh genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). 2006. Implications for Caribbean and Central American biogeography. *Mol Biol Evol* 13:642–649.
- Nei, M. 1985. Human evolution at the molecular level. Pp. 41-64 in: Ohta, T and Aoki,K,eds. *Population genetics and molecular evolution*. Japan Scientific Societies, Tokyo.
- Nelson JS. 2006. *Fishes of the world*. 4rd edition, John Wiley e Sons., Inc., New York, USA.

Nesbø, C.L., Rueness, E.K., Iversen, S.A., Skagen, D.W., Jakobsen, K.S., 2000. Phylogeography and population history of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): a genealogical approach reveals genetic structuring among the eastern Atlantic stocks. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 267, 281–292.

Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*, 35, 81-100.

Oliveira Ribeiro A., Caires R.A., Mariguela T., Pereira L.E.G, Hanner R., Oliveira C. Dna barcodes identify marine fishes of são paulo state, Brazil. *Molecular ecology resources*. 2012. 12, 1012–1020.

Ornelas-García CP, Domínguez-Domínguez O, Doadrio I. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol Biol* 8:340.

Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C. and Hnner, R. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Mol. Ecol. Resour.* 9:42 - 50.

Palumbi SR. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology, evolution and Systematics*, 25, 547-572.

Palumbi SR, Baker CS. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 426-435.

Park, H.H., E. Logette, S. Raunser, S. Cuenin, T. Walz, J. Tschopp, H. Wu Cell, 128. 2007. pp. 533–546

Pardini AT, Jones CS, Noble LR. 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, Cunha C, Coelho MM. 2004. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 192-203.

Perdices A, Sayanda D, Coelho MM. 2005. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* Teleostei, Cyprinidae. in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 920-927. Purdom CE (1993) Genetics and Fish breeding. Chapman and Hall editors. London.

- Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* 14: 20
- Pillai NG, Satheeshkumar P. 2012. Biology, Fishery, Conservation and Management of Indian Ocean Tuna. *Fisheries Ocean Science Journal*, 47(4), 411-433.
- Pujolar, J.M., Roldán, M.I., Pla, C. 2001. Allozyme differentiation of bonito in the Mediterranean Sea. *J. Fish Biol.*, 59: 169-174.
- Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, et al. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. Biol. Sci.* 275: 237-247
- Rasmussen RS, Morrissey MT, Hebert PDN. 2009. DNA barcoding of commercially important Salmon and Trout species (*Oncorhynchus* and Salmon) from North America. *J Agric Food Chem* 57:8379–8385.
- Reeb CA, Arcangeli L, Block BA. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 136, 1123 -1131.
- Rodrigues, F; Farias, I; Batista, J; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genetics Resources*.
- Rey, J.C., E. Alot, A. Ramos. 1984. Sinopsis biológica del bonito, *Sarda sarda* (Bloch), del Mediterráneo y Atlántico Este. *Iccat, Coll. Vol. Sci. Pap.* 20(2): 469-502.
- Rícan O, Piálek L, Zardoya R, Doadrio I, Zrzavy. 2013. J: Biogeography of the Mesoamerican cichlidae (Teleostei: Heroini): colonization through the GAARlandia land bridge and early diversification. *J Biogeogr* 40: 579–593.
- Roberti, M., C. Yannopoulos, G. De Metrio, A. Ludovico, F. Milella, A. Carone, P. Megalofonou, P. Cantatore, M. N. Gadaletta. 1993. Analysis of nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome B gene in three *Sarda sarda* (Bloch 1793) stocks from Mediterranean Sea. *Italian Journal of Biochemistry* 42 (5): 311 – 313.
- Rock J, Costa FO, Walker DI, North AW, Hutchinson WF, Carvalho GR. 2008. DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarctic Science*, 20, 253–262.
- Rosel, P.E., Block, B.A. 1996. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.* 125, 11 –22.
- Rosso JJ, Mabragaña E, Castro MG, Díaz de Astarloa M: DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Mol Ecol Res* 2012, 12:999-1011.

Rubioff D, Cameron S, Will K . 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for 'barcoding' identification. *Journal of Heredity* , 97, 581 – 594.

Ruiz-Capillas C, Moral A. 2005. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89, 347–354.

Saccone C, Preparata G, Lanave C. 1987. Chance, stochasticity and evolution: the Markov clock. In: Quagliariello E, Bernardi G, Ullmann A (eds) *Enzyme adaptation to natural philosophy: heritage from Jacques Monod*. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), pp 159-172

Santos, M.D.C.F; Ruffino, M.L and Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *J. Fish Biol.*, 71a: 33-44.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425

Saxton BL. 2009. Historical Demography and Genetic Population Structure of the Blackfin Tuna (*Thunnus atlanticus*) from the Northwest Atlantic Ocean and the Gulf of Mexico. Master's thesis, Texas A&M University. Available electronically from [http : / /hdl .handle .net /1969 .1 /ETD -TAMU -2009 -05 -588](http://hdl.handle.net/1969.1/ETD-TAMU-2009-05-588)

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, et al. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol:360, ISSN:0962-8436, Pages:1805-1811

Sharp GD. 1978. Behavioural and physiological properties of tuna and their effects on vulnerability to fishing gear. In *The Physiological Ecology of tunas* (Eds) Sharp GD, Dizon AE. 397 – 449. New York, Academic Press

Schultz MB, Ierodiaconou DA, Smith SA, Horwitz P, Richardson AMM, Crandall KA, Austin CM (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.

Sebastian H, Haye PA, Shivji MS. 2008. Characterization of the pelagic shark-fin trade in north-central Chile by genetic identification and trader surveys. *Journal of Fish Biology*, 73, 2293-2304.

Schrey AW, Heist EJ. 2003. Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60, 670-675.

Shedlock AM, Parker JD, Crispin DA, Pietsch TW, Burner GC. 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial DNA control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1, 179–192.

- Shivji M, Clarke S, Pank M. 2002. Genetic identification of pelagic shark body part for conservation and trade monitoring. *Conservation Biologist*, 16, 1036-1047.
- Silas,EG, Pillai PP .1982. Resources of tunas and related species and their fisheries in Indian ocean . Bull. Cent. Mar. Fish. Res.Inst.,32: 17 4p
- Smith GR. 1992. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Systematics Biology*, 41, 41-57.
- Souza FL, Cunha AF, Teixeira MA, Pereira GAG, Reis SF. 2003. Preliminary phylogeographic analysis of the neotropical freshwater turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae). *Journal of Herpetology*, 37, 199-205.
- Spruell, P., Rieman, B.E., Knudsen, K.L., Utter, F.M., Allendorf, F.W. 1999. Genetic population structure within streams: microsatellite analysis of bull trout populations. *Ecology of Freshwater Fish* 8: 114–121
- Stoeckle, M. 2003 Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *Bioscience* 53:796-797.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. 2006. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol.* 575:758–771
- Steinke D, Zemlak TS, Boutillier JA, Hebert PDN. 2009a. DNA barcoding Pacific Canada's fishes. *Mar Biol* 156:2641–2647
- Steinke D, Zemlak TS, Hebert PDN. 2009b. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE*, 4, e6300.
- Stepien C. 1995. Population genetic divergence and geographic patterns from DNA sequences: examples from marine and freshwater fishes. *Am. Fish. Soc. Sym*, 17, 263 - 287.
- Strecker AL, Cobb TP, Vinebrooke RD. 2004. Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds. *Limnology and Oceanography*, 49, 1182-1190.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thangaraj M, Lipton AP. 2010. Genetic Identity of Three Indian Populations of Three Spotted Seahorse, *Hippocampus trimaculatus* *Advances in Biological Research*, 4 (1): 37-41.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739

Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Taylor, H.R. and Harris, W.E. 2012. 'An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding', *Molecular Ecology Resources*, 12 (3), 377-88.

Theisen, T.C., Bowen, B.W., Lanier, W., Baldwin, J.D. 2008. High connectivity on a global scale in the pelagic wahoo. *Acanthocybium solandri* (tuna family Scombridae). *Molecular Ecology* 17:4233 – 4247

Triantafyllidis A, Krieg F, Cottin C, Abatzopoulos TJ, Triantaphyllidis C, Guyomard R. 2002a. Genetic structure and phylogeography of European catfish (*Silurus glanis*) populations. *Molecular Ecology*, 11, 1039-1055.

Triantafyllidis A, Abatzopoulos TJ, Leonardos J, Guyomard R. 2002b. Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*). *Aquatic Living Resources*, 15, 351-359.

van Velzen, R., Weitschek, E., Felici, G., Bakker, F.T. 2012. DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PLoS ONE* 7: 30490

Valdez-Moreno M, Vásquez-Yeomans L, Elías-Gutiérrez M, Ivanova NV, Hebert PDN. 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research*, 61, 665–671.

Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110-117.

Vawter, A. T., Rosenblatt, R. & Gorman, G. C. 1980 Genetic divergence among fishes of the eastern Pacific and the Caribbean: support for the molecular clock. *Evolution* 34 : 705 – 711

Vences M, Thomas M, Van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers Zoology*, 2, 5.

Vergara J, Azpelicueta MM and Garcia C. 2008. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotrop. Ichthyol.*6: 75-85.

Victor BC, Hanner R, Shivji M, Hyde J, Caldow C. 2009. Identification of the larval and juvenile stages of the cubera snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding. *Zootaxa* 2215: 24–36

Viñas J, Alvarado Bremer J, Pla C. 2004a. Phylogeography of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) in the northern mediterranean: the combined effects of historical

vicariance, population expansion, secondary invasion and isolation by distance. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33: 32 – 42.

Viñas, J., Alvarado Bremer, J.R., Pla, C. 2004b. Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Marine Biology* 145: 225–232

Viñas J, Tudela S. 2009. Validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLoS ONE* 4:e7606

Viñas J, Alvarado Bremer, J.R., Pla, C. 2010. Phylogeography and phylogeny of the epimeric cosmopolitan bonitos of the genus *Sarda* (Cuvier): inferred patterns of intra- and inter-oceanic connectivity derived from nuclear and mitochondrial DNA data. *Journal of Biogeography* 37: 557–570

Wang W. 2004. RF version 2 modeling system user's guide. http://www.mmm.ucar.edu/wrf/users/docs/user_guide/. 2004.

Waples RS, Punt AE, Cope JM. 2008. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better?. *Fish and Fisheries*, 9, 423 – 449.

Waples RS. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow In marine shore fishes. *Evolution* 41:385-400

Ward, R.D. 1995. Population genetics of tunas. *Journal of Fish Biology*. 47: 259-280.

Ward, R. D., Elliott, N. G., Grewe, P. M., Smolenski, A. J. 1994. Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. *Mar. Biol. (Berl.)* 118: 531 - 539.

Ward RD, Woodward M, Skibinski DOF. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fish. *J Fish Biol* 44:213–232

Ward, R. D., Elliot, N. G., Innes, B. H., Smolenski, A. J. & Grewe, P. M. 1997. Global population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, inferred from allozyme and mitochondrial DNA variation. *Fishery Bulletin US* 95, 566-575

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol* 74:329–356

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 20

Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoret. Pop. Biol.* 7: 256–276.

Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29 (2), 188-197.

- Wenink PW., Baker AJ., Tilanus MGJ. 1993. Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long distance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*). *Proceedings of the National Academy of Science* 90:94-98
- Wen-Feng L, Deng-Fwu H. 2008. Application of species-specific PCR for the identification of dried bonito product (*Katsuoobushi*). *Food Chemistry*, 106, 390–396.
- Wiemers M and Fiedler K. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). 2007. *Frontiers in Zoology* 2007, 4:8
- Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090. In *Microbiology: A Centenary Perspective*, edited by Wolfgang K. Joklik, ASM Press. 1999, p.440.
- Wolstenholme DR. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141: 173-216.
- Wong EHK, Hanner R. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res Int* 41: 828–837.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen.* 15, 323–354.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- Wu GCC, Chian HC, Chen KS, Hsu CC, Yang HY. 2009. Population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) in the Northwestern Pacific Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*, 95, 125–131.
- Wu GC-C, Chiang H-C, Chou Y-W, et al. 2010. Phylogeography of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Pacific and the Western Indian Oceans inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*. 105 (3): 248-253
- Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal Heredity*, 92, 371–373.
- Xiao Dong Xu, XiangYun Wu, Zi Niu Yu. 2010. The mitogenome of *Paphia euglypta* (Bivalvia: Veneridae) and comparative mitogenomic analyses of three venerids[J]. *Genome*. 53(12):1041-52.
- Xu TJ, Cheng YZ, Sun YN, Shi G., Wang RX. 2010. The complete mitochondrial genome of bighead croaker, *Collichthys niveatus* (Perciformes, Sciaenidae): Structure of control region and phylogenetic considerations. *Mol Biol Rep* 38:4673-4685.
- Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., Favre-Krey, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey G., et al. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13:1785-1798.

Zhang J. 2011. Species identification of marine fishes in China with DNA barcoding. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 978253.

Zhang J, Hanner R. 2012. Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea. *PLoS ONE* 7(2): e30621.

Zemlak TS, Habit EM, Walde SJ, Battini MA, Adams EDM, Ruzzante DE. 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.