



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**Análise da diversidade genética voltada à conservação do cavalo marinho**  
***Hippocampus patagonicus* no litoral do Brasil**

Jaiane da Silva Nascimento

**Recife – PE, 2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**Análise da diversidade genética voltada à conservação do cavalo-marinho**  
***Hippocampus patagonicus* no litoral do Brasil**

Mestranda: Jaiane da Silva Nascimento

Orientador: Dr. Martín Alejandro Montes (UFRPE, Departamento de Biologia)

Coorientadoras: Dra. Ana Cristina Lauer Garcia (UFPE, Centro Acadêmicos de Vitória)

Dra. Rosana Beatriz Silveira (Instituto Hippocampus)

Início da Pós-Graduação: Março de 2017

Previsão de término: Junho de 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia (PPGE), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito obrigatório para obtenção do título de mestre em ecologia.

Linha de pesquisa: Ecologia molecular, do indivíduo e de populações.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

N244a Nascimento, Jaiane da Silva  
Análise da diversidade genética voltada à conservação do cavalo marinho  
Hippocampus patagonicus no litoral do Brasil / Jaiane da Silva Nascimento. –  
2019.

52 f. : il.

Orientador: Martín Alejandro Montes.

Coorientadoras: Ana Cristina Lauer Garcia, Rosana Beatriz Silveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e anexo(s).

1. Biologia molecular
  2. Cavalos-marinhos
  3. Marcadores genéticos
  4. População biológica
- I. Montes, Martín Alejandro, orient. II. Garcia, Ana  
Cristina  
Lauer, coorient. III. Silveira, Rosana Beatriz, coorient. IV. Título

CDD 574.5

Jaiane da Silva Nascimento

**Análise da diversidade genética voltada à conservação do cavalo marinho  
*Hippocampus patagonicus* no litoral do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ecologia (PPGE), da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco (UFRPE), como requisito obrigatório para  
obtenção do título de Mestre em Ecologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Martín Alejandro Montes - UFRPE Presidente da banca e Orientador

---

Dr. Igor Costa de Amorim – UPE - Membro titular externo

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Braga Gomes -UFRPE - Membro titular interno

**RECIFE – 2019**

*Dedico esta dissertação:*

*Primeiramente a Deus, que tem guiado todos os meus passos até aqui. Ao meu pai Antônio Sérgio do Nascimento e a minha mãe Josélia S. S. Nascimento, que sempre me apoiaram para tudo na minha jornada acadêmica. A todos os meus amigos e familiares que sempre torceram e torcem por mim!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me concede o dom da vida e que me encheu de forças e coragem para que eu não desistisse no meio do caminho.

Agradeço aos meus pais pela compreensão, apoio financeiro e emocional nesse tempo de mestrado.

Agradeço aos meus orientadores Martín Alejandro Monte e Ana Cristina Lauer Garcia, obrigada pelo suporte e ensinamentos no tempo que lhes coube, pelas suas correções, incentivos e orientação!

Agradeço a todos os professores do programa por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Ao meu namorado Lucas e meus amigos mais próximos, Michelle, Andréa, Natália, Tereza, Alef, Dijaina, Bárbara, Ramon e Rômulo, agradeço pela paciência, palavras de conforto, ombros amigos (até a distância), apoio e saidinhas de emergência meus sinceros agradecimentos!!

Agradeço ao Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA, por toda infraestrutura disponibilizada e aos companheiros de bancada, Gustavo Henrique, Letícia Gabrielly e Alan Ferreira meu muito obrigada!

Agradeço a minha turma do mestrado, ecologia 2017.1, Alef, Alan Pedro, Thaisy, Mariana, Isabela, Nídia, Iolanda e Alan Jefferson, a quem sou grata pela amizade e incentivos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por todos esses anos de assistência e cuidados que trouxeram a mim.

Agradeço ao Instituto Hippocampus pela disponibilização das amostras aqui estudadas, e a Fundação Nacional de Biologia (FUNBIO), pelo apoio financeiro do projeto.

Ao laboratório de Biodiversidade de insetos e genética de insetos, em especial ao Dr. Igor Amorim, pelo apoio e ensinamento da extração.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	9
<b>HIPÓTESE</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	15
Objetivo Geral .....	15
Objetivos Específicos .....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>ARTIGO</b> (A ser submetido na revista Aquatic Conservation).....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>ANEXO</b> (Normas para publicação no periódico).....	39

## RESUMO

Os cavalos marinhos são peixes altamente ameaçados de extinção no mundo inteiro. Entre as causas apontadas para o declínio de suas populações está a pesca indiscriminada sobre organismos não alvos, o *bycatch*. Mais de 95% dos cavalos-marinhos presentes no comércio internacional são oriundos deste tipo de pesca. Considerando o alto impacto desta ação antrópica sobre *H. patatagonicus*, o conhecimento da diversidade genética e da estruturação populacional em regiões de intensa atividade pesqueira pode auxiliar na tomada de medidas conservacionistas. Aqui avaliamos estas informações para a distribuição da espécie, com um maior foco para a análise de animais capturados por *bycatch* ao longo da costa do Rio de Janeiro, onde a atividade pesqueira é intensa. As informações genéticas foram obtidas por dados mitocondriais, a partir do sequenciamento parcial de 652 pb do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) e pelo genoma nuclear, a partir de quatro *primers* de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). As 30 sequências de COI aqui obtidas para as amostras do RJ foram analisadas conjuntamente com as depositadas no GenBank para indivíduos do Rio Grande do Sul (RS) e da Argentina (AR), revelando maior distância genética para as amostras do RJ em relação as outras duas populações. Na análise interpopulacional as amostras do RJ também foram as que apresentaram maior diversidade. A análise de similaridade por Neighbor-joining e o modelo do número de Kimura 2 parâmetros e o Baps separou em grupos monofiléticos as populações do RJ daquelas do RS e da AR. A análise molecular da variância (AMOVA) também demonstrou alta estruturação populacional ( $F_{st}=48.68$ ), separando igualmente as amostras. Os dados de ISSR revelaram 74 loci, todos polimórficos para os 60 indivíduos analisados. A distância genética intrapopulacional foi menor para os indivíduos dos grupos Macaé e Joatinga até Ilha Grande, e maior para as amostras de Ilha Rasa até Ilha de Santana. A análise de similaridade por Neighbor-joining, o modelo do número de diferenças, juntamente com teste de Evanno e análise Baysiana feitos através do Structure, definiu padrões genéticos distintos. A AMOVA revelou alta estruturação populacional para a espécie estudada ( $F_{st} = 34.33$ ). A diferenciação genética de *H. patagonicus* ao longo da costa do Rio de Janeiro reflete a importância dos estudos genéticos realizados não só em escala macro, como também microrregional, denotando a importância deste tipo de análise como forma de subsidiar ações corretas de manejo voltadas a conservação de espécies que se encontram em perigo de extinção. Essa alta estruturação populacional e a alta diversidade genética das amostras do RJ sustentam a importância de conservação dos cavalos-marinhos desta localidade sob o ponto de vista evolutivo, revelando a singularidade do patrimônio genético ali observado.

**Palavras chaves:** citocromo oxidase, estruturação populacional, ISSR.



## ABSTRACT

Seahorses are highly endangered fish worldwide. Among the causes pointed in decline of populations is indiscriminate fishing on non-target organisms, the bycatch. More 95% of seahorses present in international trade come from this type of fishing. Considering the high impact this anthropic action on *H. patagonicus*, the knowledge of genetic diversity and the population structure in regions of intense fishing activity can help to take conservation measures. Here we evaluate this information for part of the species distribution, especially with analysis of animals captured by bycatch along the coast of Rio de Janeiro, where fishing activity is intense. The genetic information has been accessed by mitochondrial data from partial sequencing of 652 bp cytochrome oxidase gene subunit I (COI) and the nuclear genome, from four primers Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). The 30 COI sequences obtained here for the samples RJ were analyzed together with GenBank database for individuals of Rio Grande do Sul (RS) and Argentina (AR) showing increased genetic distance for the samples of RJ in relation to the other two populations. In interpopulational analysis, the RJ samples were also the ones with the highest diversity. The analysis of similarity by Neighbor-joining and the model of the number of Kimura 2 parameters and the Baps separated into groups monophyletic the populations of RJ of those of RS and RA. Molecular analysis of variance (AMOVA) also showed high population structure ( $F_{st} = 48.68$ ), also separating the samples. The ISSR data revealed 74 loci, all polymorphic for the 60 individuals analyzed. The intrapopulation genetic distance was smaller for the individuals of the Macaé and Joatinga groups up to Ilha Grande, and higher for the samples from Ilha Rasa to Santana Island. The similarity analysis by Neighbor-joining, the model number of differences together with Evanno test and Bayesian analysis made through Structure, defined distinct genetic patterns, almost separating them into monophyletic groups. AMOVA revealed a high population structure for the species studied ( $F_{st} = 34.33$ ). Genetic differentiation *H. patagonicus* along the coast of Rio de Janeiro reflects the importance of genetic studies not only in macro scale, as well as in micro-regional, reflecting the importance of this type of analysis as a way to support correct management actions aimed at conservation species that are in danger of extinction. This population structure and the high genetic diversity of RJ samples support the importance of conservation of the seahorses of this locality from an evolutionary point of view, revealing the uniqueness there genetic patrimony observed.

**Keywords:** cytochrome oxidase, population structuring, ISSR.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os oceanos ocupam 70% da superfície do planeta, sendo o maior espaço de volume habitável do mundo e abrigando grande parte de sua biodiversidade. São responsáveis, entre outras funções, por influenciar o clima, gerar 70% do oxigênio atmosférico e absorver a maior parte do dióxido de carbono do planeta (Vié et al., 2009). A notável riqueza dos oceanos tem sido fortemente ameaçada por impactos antrópicos, o que tem levado, nos últimos anos, ao crescimento do número de espécies marinhas que já desapareceram ou que se encontram ameaçadas de extinção (Hughes; Ehrlich, 1997; Ceballos; Ehrlich, 2002; IUCN, 2010, Barnosky et al., 2011).

Alguns autores apontam que os humanos estão causando a sexta extinção em massa do planeta (Dirzo; Raven, 2003; Barnosky et al., 2011). Ações como a pesca excessiva, mudanças climáticas, introdução de espécies invasoras, desenvolvimento urbano costeiro, fragmentação e destruição de habitats tem sido citadas como as responsáveis pela redução da biodiversidade, sendo esta uma perda irreversível (Roberts; Hawkins, 1999).

Para muitas espécies marinhas, a mortalidade excessiva por capturas acidentais (*bycatch*) durante atividades de pesca não seletiva (Figura 1), está entre as principais ameaças por ações antrópicas (Vincent et al., 2011; Silveira et al. 2018). Em muitas regiões ao redor do mundo, a conservação da biodiversidade nos mares está ocorrendo sem dados espécie-específicos, que são essenciais para solidificar ações de conservacionistas efetivas. Proteger nossos oceanos e evitar o rápido declínio da biodiversidade nesses ecossistemas é um dos maiores desafios para conservação (Vié et al. 2009).



**Figura 1.** Cavalos-marinhos capturado por rede de pesca não seletiva (*bycatch*).

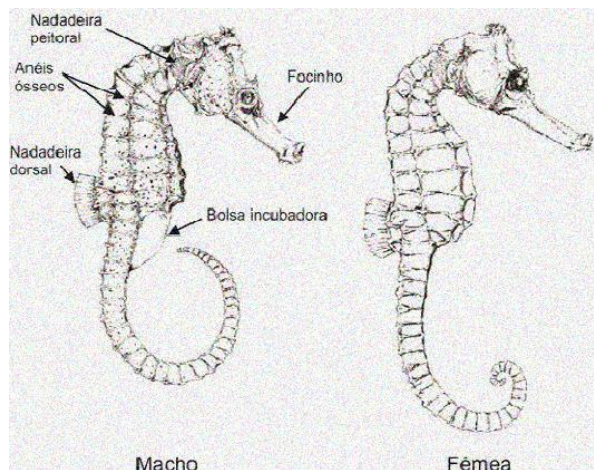
Fonte: Adaptado de [projectseahorse.org](http://projectseahorse.org)

Os cavalos-marinhos são peixes que sofrem uma grande ameaça de extinção. Das 41 espécies conhecidas, quase 25% estão listadas com algum grau de perigo de extinção,

segundo a *Red List of Threatened Species da International Union for Conservation of Nature* (IUCN 2016). Desde 2004 todas as espécies deste grupo de peixes foram adicionadas ao apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*). As três espécies de cavalos-marinhos que ocorrem na costa do Brasil, *Hippocampus patagonicus*, *H. erectus* e *H. reidi* (Silveira et al., 2014), estão classificadas como vulneráveis à extinção pelo Ministério do Meio Ambiente deste país (MMA, 2014).

Os cavalos-marinhos pertencem a ordem dos Gasterosteiformes (Foster; Vicente 2004) e a família Syngnathidae, a qual também inclui os dragões-marinhos, peixes cachimbo e cavalos-cachimbo pigmeus (Mobley et al., 2011; Wilson; Orr 2011). Todos os cavalos-marinhos são membros do gênero *Hippocampus* (Rafinesque 1810). Este é o único gênero de singnatídeos em que os machos apresentam uma bolsa incubadora totalmente fechada (Figura 2), na qual as fêmeas depositam seus ovos, sendo os machos responsáveis por fertilizá-los, nutri-los e regular o ambiente gestacional (Silveira, 2001; Laurie et al., 2016). Cada macho aceita ovócitos de apenas uma fêmea em cada ciclo reprodutivo. Esse comportamento pode durar desde um a vários ciclos, resultando em uma monogamia variável (Foster; Vincent, 2004).

**Figura 2.** Representação da vista lateral do cavalo-marinho macho e fêmea.



Fonte: Adaptado de Lourie et al. (2004).

Todos apresentam uma mesma estrutura morfológica funcional, com cabeça que lembra a de um equino, posicionada em ângulo reto em relação ao corpo; olhos independentes um do outro; focinho longo tubular, sem dentes, utilizado para sucção de presas; aparelho digestivo sem um estômago diferenciado (Stoskopf, 1993). A pele não apresenta escamas e é esticada sobre uma série de placas ósseas visíveis, formando anéis ao redor do tronco e cauda;

sendo está preênsil (Van Wassenbergh et al., 2011). Cavalos-marinhos não possuem nadadeiras pélvicas e caudais, mantendo apenas uma nadadeira dorsal propulsora, duas barbatanas peitorais, utilizadas para estabilização e direção e uma barbatana anal reduzida (Foster; Vincent, 2004).

Os cavalos-marinhos se distribuem entre as latitudes de 50°N e 50°S (Laurie et al., 2004), em águas marinhas costeiras, tropicais e temperadas (Foster; Vicente, 2004). Algumas espécies vivem em estuários onde experimentam salinidade flutuante (Whitfield, 1995). A maioria das espécies são encontradas em profundidade máxima de 30 m, enquanto poucas vivem em profundidades maiores. Um exemplo é *Hippocampus kelloggi* relatado em 90 m de profundidade nas águas da Malásia (Choo; Liew, 2003) e *H. patagonicus* capturado a 80 m de profundidade no estado do Rio de Janeiro (Rosana Silveira, dados não publicados). Espécies de regiões temperadas e tropicais vivem principalmente entre gramíneas ou bancos de algas e ecossistemas de manguezal (Foster; Vicente, 2004; Silveira, 2011). Nos trópicos encontram-se em áreas de substrato inconsolidado, onde esponjas e ascídias são abundantes (Lourie et al., 1999).

Os cavalos marinhos utilizam sua ampla variação cromática (Guimarães, 1999) para se esconder de predadores e capturar suas presas, permanecendo imóveis e mudando de cor para combinar com o meio, podendo desenvolver filamentos longos na pele, para mimetizar melhor o ambiente (Lourie et al., 1999; Silveira, 2005; Rosa et al., 2007). A curto prazo, alterações de cor também podem ocorrer durante o acasalamento e outras interações intraespecíficas (Foster; Vincent, 2004; Silveira, 2009).

Quanto a alimentação, são predadores sedentários e consomem suas presas por sucção (Silveira, 2005). Se alimentam na coluna d'água, esperando até que a presa se aproxime do focinho, adaptado para uma rápida ingestão de água (Foster; Vincent 2004). A independência dos olhos contribui neste processo, maximizando sua área de monitoramento no ambiente (Ocken, 1994). São carnívoros e podem ingerir qualquer organismo pequeno o suficiente para caber em seu focinho, principalmente pequenos crustáceos como anfípodos e outros invertebrados (Teixeira; Musick 2001; Pereira et al., 2018). Exibem comportamento bentônico quando adultos, apresentando baixa mobilidade e costumam se ancorar em vegetações e substratos com sua cauda (Rosa et al., 2007).

Populações de cavalos-marinhos apresentam distribuição esparsa quando juvenis, visto que são arrastados pelas correntes marinhas (Foster; Vincent, 2004). Não demonstram qualquer tipo de defesa territorial, como mostram a maioria dos peixes com pequenos limites territoriais (Grant, 1997). No entanto, nem todos os cavalos-marinhos possuem pequenos

limites territoriais. A maioria das espécies estudadas fazem movimentos diários limitados, porém os adultos de algumas espécies fazem migrações sazonais para águas mais profundas nos meses de inverno (Foster; Vincent, 2004). Os jovens são mais propensos a se dispersarem do que adultos, algumas espécies são claramente planctônicas imediatamente após o nascimento. O mecanismo de dispersão juvenil por meios passivos é pouco conhecido, mas pode explicar o fluxo gênico entre as populações (Foster; Vincent, 2004; Luzzato et al., 2013).

A expectativa de vida para os cavalos-marinhos varia de cerca de 1 a 5 anos dependendo da espécie (Foster; Vincent, 2004). Cavalos-marinhos sub adultos e adultos possuem poucos predadores naturais, devido à sua capacidade de camuflagem e placas ósseas que limitam a predação por animais pequenos (Lourie et al., 1999). No entanto, já foram encontrados nos estômagos de grandes peixes pelágicos (Wilson; Beckett, 1970), tartarugas-marinhas (Burke et al., 1993), pinguins e outras aves aquáticas (Kuitert, 2000). A mortalidade por predação é provavelmente maior em juvenis por serem altamente vulneráveis a peixes planctívoros e piscívoros (Foster; Vincent, 2004).

Além destas características, as pressões antrópicas representam sérios desafios para a perpetuação de diversas espécies de cavalos-marinhos. Dentre estas, a pesca não seletiva (*bycatch*), é uma das práticas que mais contribui para o decréscimo populacional destes peixes em muitas localidades. Estima-se que mais de 95% dos cavalos-marinhos presentes no comércio internacional sejam oriundos do *bycatch* (Vincent et al., 2011). No Brasil, o estado do Rio de Janeiro, com uma zona costeira de 640 km de extensão, é um dos principais portos pesqueiros do país onde se tem ocorrência do *bycatch* (Begot & Vianna 2014). Estudos prévios nesta região têm sugerido diminuição populacional dos cavalos-marinhos (Ferreira & Silveira 2015; Vidon & Silveira 2015), sendo esta uma região altamente importante para estudos conservacionistas com estes peixes.

*Hippocampus patagonicus*, o cavalo-marinho do focinho curto, se distribui desde o Rio de Janeiro, Brasil até a Argentina (Piacentino & Luzzatto, 2004; Silveira et al., 2014).

Embora pouco se saiba sobre este cavalo-marinho, um estudo recente sobre hábitos alimentares afirma que é um predador versátil, com capacidade de consumir uma grande variedade de itens de presas (Pereira et al. 2018). Como visto para outras espécies de cavalos-marinhos (Woods 2002; Kuitert 2003), *H. patagonicus* agarra os substratos com sua cauda durante períodos de forte correnteza, aproveitando-se do potencial de movimento da maré na movimentação de potenciais presas. Nestas condições extremas, desenvolve um

comportamento oportunista, aproveitando o ambiente natural onde organismos vulneráveis são abundantes (Storero, Gonzalez 2008).

Conhecer a espécie, sua ecologia e história de vida é importante no desenvolvimento de estratégias de conservação ao longo da costa brasileira, uma vez que a densidade de cavalos-marinhos é baixa e suas populações se distribuem em manchas (Foster; Vincent, 2004). Compreender a distribuição das espécies na costa pode fornecer informações úteis para conservação das espécies de cavalos-marinhos no Brasil.

No Brasil *H. patagonicus* tem sido apontada como uma das mais afetadas pelo *bycatch* em monitoramentos realizados no sul do país (Silveira et al., 2018). Esta espécie está classificada como ameaçada de extinção na categoria vulnerável pela legislação brasileira (MMA, 2014), seguindo os critérios da IUCN. As espécies ameaçadas de extinção muitas vezes necessitam de intervenções diretas que assegurem a sua sobrevivência.

Em vista dos problemas de conservação enfrentados pelos cavalos-marinhos, o conhecimento da diversidade genética e da estruturação populacional pode contribuir para a preservação destes organismos tão ameaçados. Descobrir a abundância, dinâmica de dispersão e recrutamento podem ajudar a prever os padrões demográficos (Luo et al., 2015), para entender os padrões de comportamento, interações ecológicas que afetam os cavalos-marinhos como concorrentes, presas, predadores; e o fluxo de genes que podem se conectar e sustentar as populações, gerando subsídios para ações corretas de manejo (Frankham et al., 2008).

Dessa maneira, parâmetros genéticos podem oferecer precisão na tomada de decisões acerca da conservação (Desalle; Amato, 2004), uma vez que a diversidade genética é fundamental para garantir a sobrevivência das espécies (Frankham, 1996).

Os marcadores utilizados para avaliar a diversidade genética e a estruturação de populações podem utilizar informações nucleares e/ou mitocondriais. Dentro do primeiro grupo, a metodologia de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) tem sido utilizada em estudos conservacionistas (Jin; Li, 2007; Garayalde et al., 2011; Liu et al., 2013; Domingos et al., 2014; Zheng et al., 2015), incluindo cavalos-marinhos (Montes et al., 2018; Sanna et al., 2008). Trata-se de uma metodologia fundamentada no anelamento de oligonucleotídeos iniciadores dentro de regiões de microssatélites e amplificação, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), das regiões entre os microssatélites. Entre as vantagens da metodologia de ISSR está a alta taxa de replicabilidade dos fragmentos amplificados para um mesmo indivíduo e a possibilidade de analisar a variabilidade total do genoma sem a necessidade do conhecimento prévio do mesmo (Bornet e Blanchard, 2001).

Dentre os marcadores mitocondriais as informações do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) têm sido uma das mais empregadas em estudos voltados a biologia da conservação, incluindo estudos com cavalos-marinhos (Singh et al., 2011; Luzzatto et al., 2012; Silveira et al., 2014; Canção et al., 2014; Chen et al., 2018;). A evolução deste gene é suficientemente rápida para permitir não só a diferenciação de espécies próximas, mas também de grupos filogeográficos dentro de uma única espécie (Wares & Cunningham 2001).

A partir do cenário aqui descrito que salienta os graves problemas conservacionistas enfrentados pelos cavalos-marinhos, especialmente pela prática da pesca não seletiva, o presente estudo se propõe a avaliar, a partir de marcadores de informações mitocondriais e nucleares, a diversidade genética e a estruturação populacional de *H. patagonicus*.

## **HIPÓTESE**

Neste projeto serão testadas as hipóteses de que: a) as populações *H. patagonicus* do litoral do Brasil apresentam baixa diversidade genética devido ao seu status de conservação e b) alta estruturação genética, ocasionada pela ausência de movimentação de indivíduos ao longo de diferentes zonas geográficas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial evolutivo e a estruturação populacional de *H. patagonicus* ao longo do litoral do Brasil.

### **Objetivos Específicos**

- Mensurar o número de haplótipos e a distância genética (inter e intrapopulacional) de *H. patagonicus*.
- Determinar o grau de organização da diversidade genética na espécie estudada.

## REFERÊNCIAS

- International Union for Conservation of Nature. 2016. <http://www.iucnredlist.org/> acesso em: 14 de julho de 2018.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria Nº445, de 17 dezembro de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 de dez. 2014.
- BARNOSKY, A. D. *et al.* Has the Earth/'s sixth mass extinction already arrived? **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51-57, 2011.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 1, p. 209-215, 2001.
- CANÇÃO, H.; MABUCHI, K. Sequência completa do genoma mitocondrial do cavalo-marinho espinhoso *Hippocampus histrix* (Gasterosteiformes: Syngnathidae). 2014
- CARDOSO, M. L.V. **Diversidade genética do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no litoral do nordeste do Brasil**. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Vitória de Santo Antão.
- CHEN, M. *et al.* O genoma mitocondrial completo do *Hippocampus hippocampus* Linnaeus 1758 (Syngnathiformes: Syngnathidae) e suas implicações filogenéticas. **Conservation Genetics Resources**, v. 10, n. 4, p. 783-787, 2018.
- DESALLE, R.; AMATO, G. The expansion of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 9, p. 702-712, 2004.
- DIAS, T. L.; ROSA, I. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus erectus* Perry, 1810 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 65, n. 3, p. 326-326, 2002.



DOMINGOS, T. J. *et al.* Genetic and morphological diversity of *Moenkhausia oligolepis* (Characiformes: Characidae) populations in the tributaries of the Araguaia River, Brazil: implications for taxonomy and conservation. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 13, n. 3, p. 7979, 2014.

FOSTER, S. J.; VINCENT, A. C. J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **Journal of fish biology**, v. 65, n. 1, p. 1-61, 2004.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J.D. **Introdução à genética da conservação**. Washington: Cambridge University Press, 2002.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 259 p.

FROESE, R.; PAULY, D. Fishbase, 2015. Disponível em: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org). Acesso em: junho 2017.

GARAYALDE, A. F. *et al.* Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. **Annals of Applied Biology**, v. 158, n. 3, p. 305-317, 2011.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 629-636, 2001.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1, p. 313–321, 2003.

JIN, ZEXIN.; LI, JUNMIN. Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Forest ecology and management**, v. 245, n. 1, p. 130-136, 2007.

LIU, J. et al. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14860-14871, 2013.

KUITER, R. H. Revision of the Australian seahorses of the genus *Hippocampus* (Syngnathiformes: Syngnathidae) with descriptions of nine new species. **Records-Australian Museum**, v. 53, n. 3, p. 293-340, 2001.

LOURIE, S. A. et al. **A guide to the identification of seahorses. Project Seahorses and traffic North America**. Washington: University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004. 114 p.

LOURIE, S. A. *et al.* **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. Project Seahorse, 1999. 2014 p.

LUZZATTO, D. C. *et al.* A presença do cavalo-marinho *Hippocampus patagonicus* no mar argentino com base na sequência de DNA mitocondrial do citocromo b / Presença de l'hippocampe *Hippocampus patagonicus* en mer d'Argentine demontree par sequencage du cytochrome b. **Cybium, International Journal of Ichthyology**, v. 36, n. 2, p. 329-334, 2012.

LUZZATTO, D.C.; ESTALLES, M.L.; ASTARLOA, J.M.D. Rafting seahorses: the presence of juvenile *Hippocampus patagonicus* in floating debris. **Journal of Fish Biology**, v. 83, n. 3, p. 677-681, 2013.

MONTES, M. A. et al. Diversidade genética e estrutura populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) no nordeste do Brasil: uma abordagem conservacionista. **Conservação Aquática: Ecossistemas Marinhos e de Água Doce**, v. 28, n. 5, p. 1114-1122, 2018.

PEREIRA, L.; SILVEIRA, R.; ABILHOA, V. Feeding habits of the seahorse *Hippocampus patagonicus* (Actinopterygii: Syngnathiformes: Syngnathidae) on the southern coast of Brazil. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.48, n. 1, p.267 - 271, 2018.

ROSA, I. L.; DIAS, T. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 64, n. 4, p. 378- 378, 2002.

SANNA, Daria *et al.* Região de controle do mtDNA e análise de D-HPLC: um método para avaliar o sistema de acasalamento em Syngnathidae (Teleostei). **Biologia Marinha**, v. 153, n. 3, p. 269-275, 2008.

SILVEIRA, R. B. *et al.* Records of bycatch of *Hippocampus patagonicus* (Pisces: Syngnathidae) in commercial fishing in southern Brazil. **Revista Latino-Americana de Pesquisas Aquáticas** , v. 46, n. 4, p. 744-755, 2018.

SILVEIRA, R. B. **Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil**. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Pontifca Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, PUCRS.

SILVEIRA, R. B. Comportamento reprodutivo e desenvolvimento inicial de *Hippocampus reidi*. p. 115-122, 2000.

SILVEIRA, R. B.; FONTOURA, N. F. Fecundity and fertility of the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae), in tropical Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 362- 367, 2010.

SILVEIRA, R.B. Cavalos-marinhos e os fatores que afetam seu atual estado de conservação. **Aquarium**, v. 31, n. 1, p. 15-17, 2001.

SILVEIRA, R. B. Registros de cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) ao longo da costa brasileira. **Oecologia Australis**. v.15, n. 1, p.316 - 325, 2011.

SILVEIRA, R. B. Alguns aspectos da reprodução e desenvolvimento de cavalos marinhos. Embriologia. 2º ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2001.

SILVEIRA, R. B. Sobre o comportamento sexual do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Pisces: Syngnathidae) em laboratório. **Biociências**, v.17, n. 1, p.20 - 32, 2009.

SILVEIRA, R. B. *et al.* Evidências morfológicas e moleculares para a ocorrência de três espécies de *Hippocampus* (Teleostei: Syngnathidae) no Brasil. **Zootaxa**, v. 3861, n. 4, p. 317-332, 2014.

SINGH, K. V. *et al.* Identificação molecular e relação filogenética de cavalos-marinhos, *Hippocampus kuda* (Bleeker 1852) usando sequências mitocondriais do gene 16S rRNA e COI das costas leste e oeste da Índia. 2011

THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Red List of Threatened Species. 2017. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em: 25 junho 2017.

TOBE, S. S.; KITCHENER, A. C.; LINACRE, A. M. T. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. **Plos One**, v. 5, n. 11, e14156, 2010.

VIÉ, J. C.; HILTON T C.; STUART, S. N. (Ed.). **Wildlife in a Changing World – An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species**. Gland: The International Union for Conservation of Nature. 2009. 157 p.

ZHENG, W. H. *et al.* Conservation and population genetic diversity of *Curcuma wenyujin* (Zingiberaceae), a multifunctional medicinal herb. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 10422 -10432, 2015.

**ARTIGO**

**Diversidade genética e estrutura populacional do cavalo-marinho  
*Hippocampus patagonicus* (Piacentino & Luzatto, 2004): uma perspectiva  
conservacionista**

Trabalho a ser submetido para a revista Aquatic Conservation: Marine and Freshwater  
Ecosystems Qualis A2 em Biodiversidade.

## INTRODUÇÃO

O elevado nível de perturbações antrópicas nos ecossistemas naturais representa um dos maiores desafios para a conservação da biodiversidade (Rodrigues et al., 2004). No ambiente marinho estima-se que aproximadamente 4% das espécies de peixes apresente algum grau de perigo de extinção (Vié et al., 2009). Os impactos generalizados das atividades humanas nos oceanos causam declínios acentuados na diversidade e na abundância de espécies (Butchart et al., 2010). Uma das ameaças mais urgentes aos estoques de peixes do mundo é a pesca comercial, especialmente a que resulta na captura indiscriminada sobre organismos não alvos, referida como *bycatch*. Os dados de pesca revelam que o *bycatch* representa mais de 40% das capturas marinhas anuais no mundo e quase 60% das ocorridas no Brasil (Davies et al., 2009).

Os cavalos-marinhos fazem parte do *bycatch* da pesca de emalhe de fundo ou superfície e esta tem sido uma das práticas que mais tem ameaçado a existência de suas espécies (Silveira et al., 2015). Alguns autores alertam que mais de 95% dos cavalos-marinhos presentes no comércio internacional são oriundos do *bycatch* (Vincent et al., 2011), além desta ameaça os cavalos marinhos apresentam características biológicas que os tornam especialmente vulneráveis aos distúrbios antrópicos (Foster & Vincent, 2004; Lourie et al., 2004; Cardoso 2016). No Brasil ocorrem três espécies destes peixes: *Hippocampus erectus*, *H. reidi*, e *H. patagonicus* (Silveira et al., 2014), todas classificadas como vulneráveis a extinção pelo Ministério do Meio Ambiente deste país (MMA 2014). Destas, *H. patagonicus* também está classificada como vulnerável na lista vermelha da IUCN (Wei et al., 2017).

O Rio de Janeiro, com uma zona costeira de 640 km de extensão, é um dos principais portos pesqueiros do Brasil onde se pratica pesca não seletiva, principalmente a pesca de arrasto (Begot & Vianna 2014). Estudos na região tem apontado diminuição populacional dos cavalos-marinhos, com mudanças anuais acentuadas (Ferreira & Silveira 2015). Estudos nesta região tem sugerido diminuição populacional dos cavalos-marinhos (Ferreira & Silveira 2015). Dados de monitoramentos de embarcações realizadas no litoral sul do Brasil, onde também é praticado a pesca de arrasto, estimam que mais de 8.000 cavalos-marinhos são capturados anualmente por este tipo de pesca, destacando-se em abundância *H. patagonicus* (Silveira et al., 2018). Esta espécie, também conhecida como cavalo-marinho de focinho curto, se distribui desde o Rio de Janeiro, Brasil até a Argentina (Piacentino & Luzzatto, 2004; Silveira et al., 2014).

Diante dos problemas de conservação enfrentados pelos cavalos-marinhos, especialmente por *H. patagonicus*, torna-se fundamental obter informações que auxiliem em ações corretas de manejo visando a conservação desta espécie. Nesta perspectiva a análise da diversidade genética e da estruturação populacional permite avaliar o potencial evolutivo da espécie e gerar informações relevantes para estratégias de manejo e conservação (Frankham et al., 2008). No presente artigo avaliamos essas informações para *H. patagonicus* ao longo de sua distribuição e, de forma especial, em diferentes pontos geográficos do litoral do Rio de Janeiro a partir de dados mitocondriais e nucleares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Áreas de coleta

Amostras de *H. patagonicus* foram obtidas a partir do *bycatch* da pesca de arrasto de camarão, ao longo do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras foram coletadas nos seguintes pontos: 1) ao longo da costa de Macaé, 2) desde a costa de Ilha de Santana até Ilha Rasa, 3) no litoral de Joatinga até Baía de Ilha Grande (Figura 1). De cada indivíduo foi retirada uma porção da nadadeira dorsal e fixada em álcool absoluto para extração de DNA.



Figura 1. No canto superior esquerdo mapa da América do Sul (em verde) com destaque (em vermelho) para o litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Esta região aparece ampliada com indicação dos locais onde foram obtidas amostras genéticas de *Hippocampus patagonicus*.

### Análise genética

A extração de DNA das amostras foi realizada através de uma adaptação do método de fenol/clorofórmio, segundo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001).

O DNA mitocondrial foi acessado a partir do sequenciamento parcial de 652 pares de bases do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) de 30 indivíduos coletados na Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro. Os *primers* usados para a amplificação foram FishF1, FishR1, descritos por Ward et al (2005). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 40µl, 23,5µl de H<sub>2</sub>O, 8µl de Buffer (MgCl<sub>2</sub> + tampão), 2µl de dNTPs, 2µl de *primer* F, 2µl de *primer* R, 0,5µl de Taq DNA polimerase (Macrogen kit®) e 2µl de DNA genômico por amostra. Um controle negativo, sem DNA, foi utilizado em cada reação para certificar a ausência de contaminação.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 40 repetições a 94°C por 1 minuto para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto de extensão e finalizadas com um ciclo de extensão final à 72°C por 5 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram preparados em uma mistura com 3µL do produto de PCR, 1µL de GelRed 10.000X (Biotium, Hayward, CA, USA) e 1µL de tampão de carregamento azul de bromofenol a 0,25% e separados por eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 3% em tampão TBE 0,5X. As condições da eletroforese foram 100V, 110mA e 100W constantes por 1 hora. Os géis obtidos foram fotografados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®).

Os produtos amplificados foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen, na Coreia. As sequências de COI foram editadas e alinhadas utilizando o programa BioEdit, versão 7.0.5.2 (Hall 1999). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank para *H. patagonicus* pertencentes indivíduos do Rio Grande do Sul (Brasil) e da Província de Rio Negro (Argentina).

O DNA nuclear foi acessado utilizando a metodologia de ISSR, para o qual foram avaliados 60 indivíduos do litoral do Rio de Janeiro. Quatro *primers*, (AC)<sub>6</sub>AT, (CA)<sub>6</sub>GC, (CA)<sub>6</sub>AG e (AGC)<sub>4</sub>T, foram selecionados de um total de 20, por produzirem alto número de fragmentos de DNA polimórficos, facilmente identificáveis e por apresentarem repetitividade de resultados em um mesmo indivíduo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os *primers* de ISSR selecionados, foram realizadas em um volume total de 20µl, contendo 20 ng do DNA molde, 0,25 µM de



cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 200 nM de *primer*, 2,5 µl de tampão de PCR 10X, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade Taq DNA polimerase (Macrogem kit®) e água destilada. Um controle negativo, sem DNA, foi utilizado em cada reação para certificar a ausência de contaminação.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos de extensão, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos de DNA que foram amplificados receberam a adição do corante GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) e do tampão de carregamento azul de bromofenol a 25% e foram separados em eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 0,5X corridos a 90 V, 100 mA e 110 W constantes por 2h30 min. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®). Um terço das amostras foi amplificado em duplicata para assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade do padrão de bandas. Apenas os fragmentos de DNA que mostraram amplificação consistente foram considerados.

A partir da análise dos fragmentos de DNA amplificados nos géis de ISSR foram criadas tabelas binárias de presença e ausência (Microsoft Office 2007).

Para os dados mitocondriais e nucleares foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA) no programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier e Lischer 2010), originando matrizes de distância entre e dentro os grupos geográficos amostrados. Cálculos de distâncias genéticas e dendogramas foram construídos com o programa Mega 6 (Tamura et al., 2013).

Em relação aos dados gerados pelas matrizes de ISSR, o programa Structure 2.3, que avalia a estrutura genética utilizando a análise Bayesiana, foi utilizado para estimar o número mais provável de populações (Pritchard et al., 2000). O programa foi corrido com cinco cadeias independentes para cada valor de K de 1 a 10, com 10<sup>6</sup> replicações, sendo descartadas as primeiras 10<sup>4</sup> gerações. Os modelos de ausência de mistura e frequências alélicas independentes foram utilizados nesta análise. O número mais provável de populações foi estimado pelo teste de Evanno, de acordo com os valores do modelo ( $\Delta K$ ), com base na segunda ordem de taxa de mudança, em relação a K, com a função de verossimilhança (Evanno et al., 2005).

Para determinar a estruturação espacial das informações genéticas obtidas com COI foi utilizado o software *Bayesian Analysis of Population Structure* (BAPS versão 6.0, Corander et al. 2008; Cheng et al. 2013). O número de grupos variou entre 1 e 40 com 10

réplicas para cada número de grupo, 10.000 interações realizadas com o método de simulação de Monte Carlo via Cadeias de Markove 10% de burn-in.

## RESULTADOS

### Análises de COI

Foram analisadas 40 sequências parciais de 652 pares de bases do gene COI, sendo 30 de amostras de *H. patagonicus* do Rio de Janeiro, obtidas neste estudo e 10 de sequencias depositadas no GenBank (quatro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil e seis da província de Rio Negro, Argentina).

Foram obtidos 22 haplotipos, mostrando uma alta diversidade haplotídica (0,853) e baixa diversidade nucleotídica (0,00796)

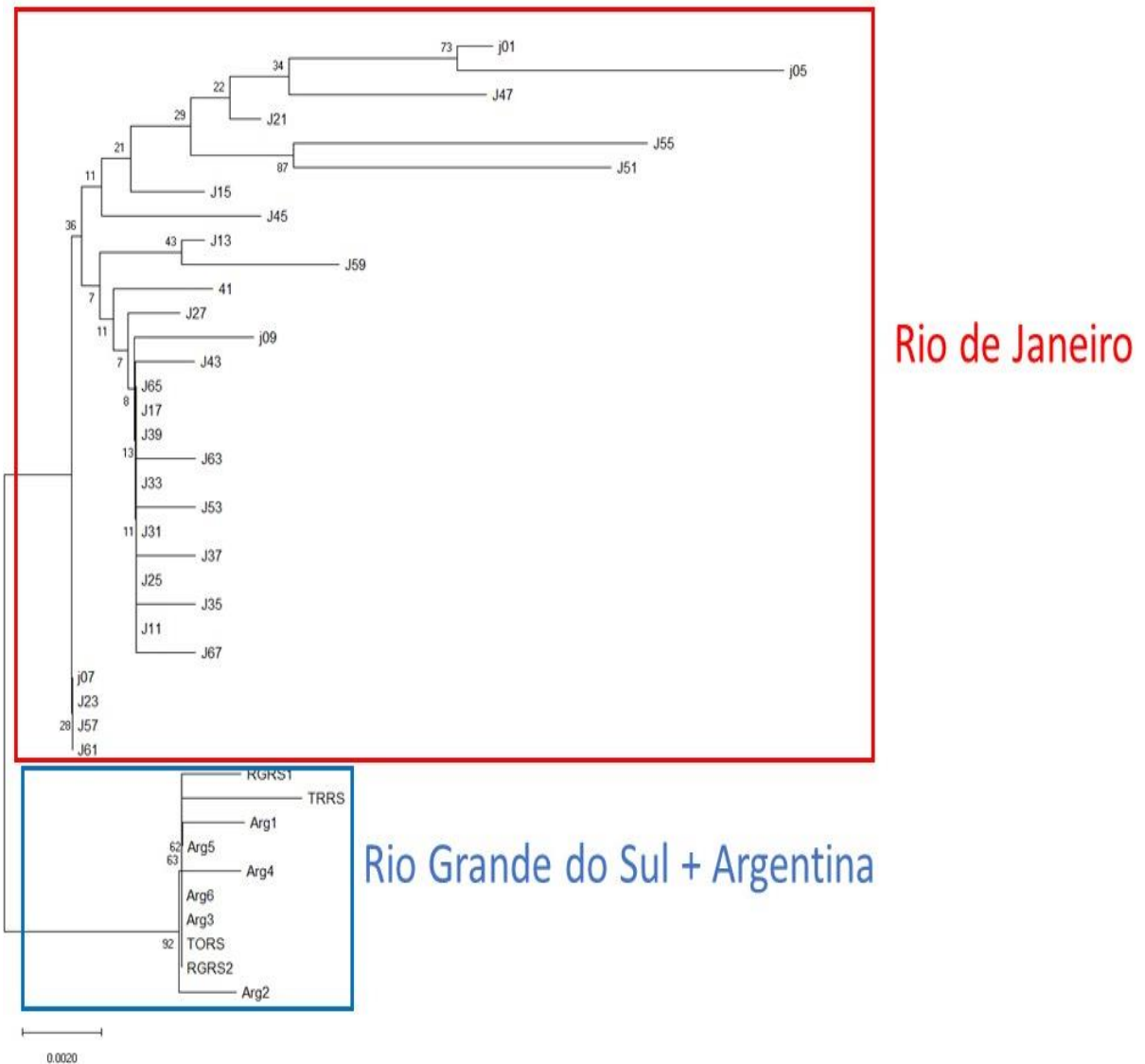
A distância genética interpopulacional mostrou alta diferenciação para os indivíduos de *H. patagonicus* procedentes da costa do Rio de Janeiro e baixa diferenciação entre os indivíduos desta espécie procedentes do litoral do Rio Grande do Sul e da Argentina (Tabela 1)

**Tabela 1.** Distância genética em *Hippocampus patagonicus* medida a partir da sequência parcial do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1. A distância genética foi calculada com o modelo de Kimura 2 parâmetros. Nas células com fundo cinza está indicada a distância intragrupos e nas células com fundo branco a distância intergrupos.

	Rio de Janeiro	Rio Grande do Sul	Argentina
Rio de Janeiro	0,0073	0,012	0,012
Rio Grande do Sul		0,0023	0,002
Argentina			0,0018

A análise de similaridade pelo algoritmo de Neighbor-joining e o modelo de Kimura 2 parâmetros separou em dois grupos monofiléticos as amostras de *H. patagonicus* procedentes da costa do Rio de Janeiro daquelas do Rio Grande do Sul e da Argentina (Figura 2a). A rede de haplótipos mostrou a mesma configuração (Figura 2b)

A análise de BAPS revelou diferenciação genética entre as amostras de *H. patagonicus* procedentes da costa da Argentina e do Rio Grande do Sul daquelas coletadas no litoral do Rio de Janeiro (Figura 3).



**Figura 2a.** Árvore de Neighbor-Joining para *Hippocampus patagonicus*, construída usando o modelo de Kimura 2 parâmetros para indivíduos coletados na costa dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul (Brasil) e da Argentina.

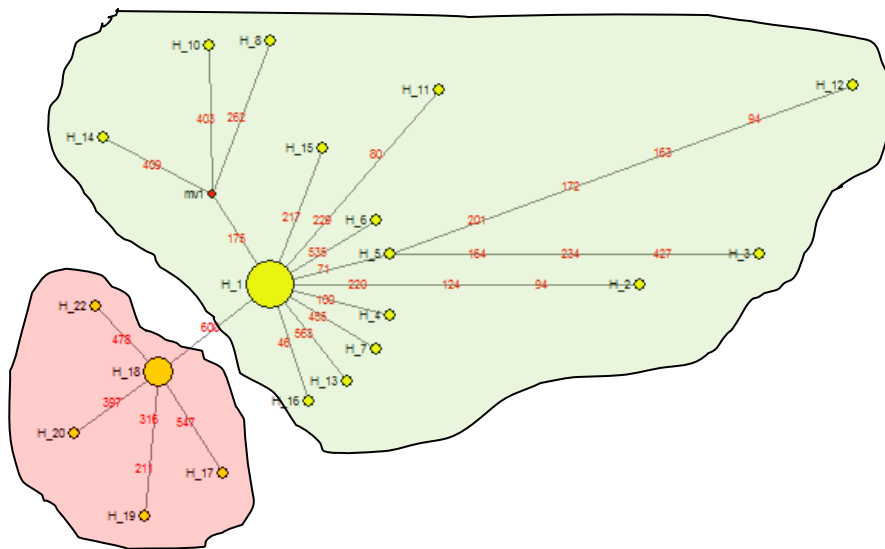
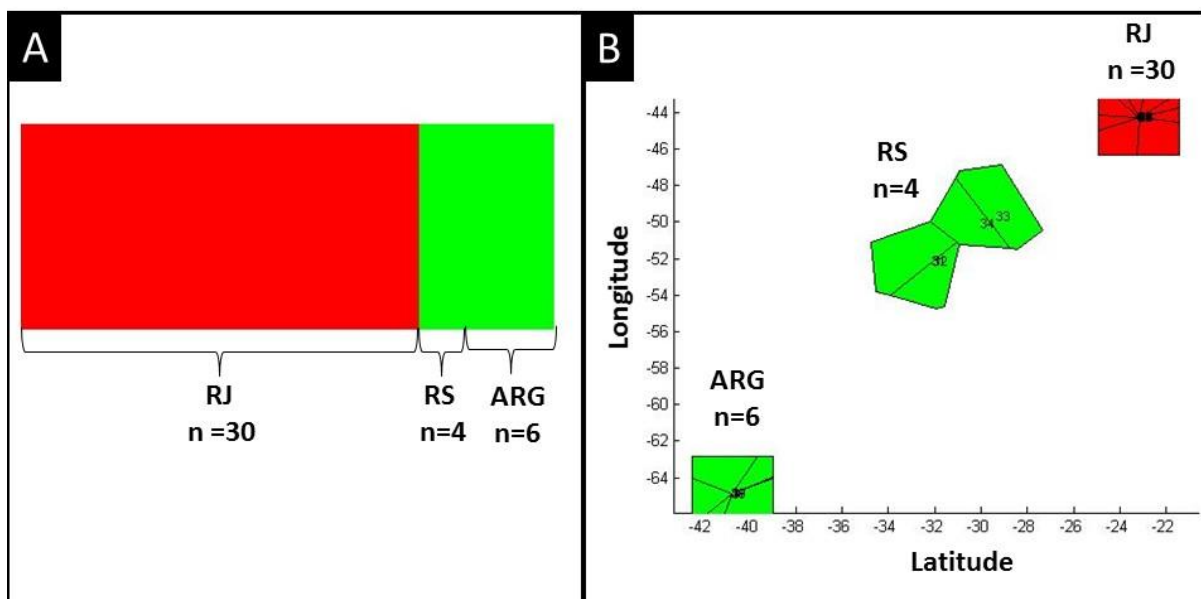


Figura 2b: rede de haplótipos *Hippocampus patagonicus* obtida pelo sequenciamento de 650 pares de bases do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1. Fundo Verde para os haplótipos de Rio de Janeiro, fundo vermelho para os de Argentina e Rio grande do Sul.



**Figura 3.** Estrutura populacional de *Hippocampus patagonicus* obtida pelo sequenciamento de 650 pares de bases do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 realizada com análise bayesiana. A) Perfil genético obtido pelo BAPS. B) Distribuição geográfica dos perfis genéticos. RJ = Rio de Janeiro, Brasil, RS= Rio Grande do Sul, Brasil, ARG = Rio Negro, Argentina.

A partir dos dados de distância genética da árvore Neighbour Joining e dos resultados da análise de BAPS foi realizada a AMOVA, a fim de quantificar a diferença genética entre o grupo formado pelas amostras da Argentina e do Rio Grande do Sul em relação ao do grupo do Rio de Janeiro. Foi observado alta estruturação entre os dois grupos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise da variância molecular para *Hippocampus patagonicus* do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Argentina, usando sequências parciais de 652 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1. GL= graus de liberdade.

Agrupamento	Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componente da variância	Porcentagem de variação
Dois grupos					
	Entre populações	1	37.117	2.02728	48.68
	Dentro das populações	37	79.083	2.13739	51.32

O teste de Tajima apresentou um valor de - 1.46931, sendo não significativo. Já o teste de Fu foi de - 3.39830, sendo significativo. Mostrando assim sinais de expansão.

### Análises de ISSR

Os resultados combinados dos quatro *primers* de ISSR utilizados permitiram a identificação de 74 loci entre 100 e 1.500 pares de bases, sendo todos polimórficos nos 60 indivíduos de *H. patagonicus* analisados (Tabela 3). Somente dois indivíduos apresentaram a mesma combinação para os quatro *primers*, sendo um procedente da costa de Macaé e outro proveniente da captura pela rede de arrasto passada desde a costa de Joatinga até Baía de Ilha Grande.

**Tabela 3.** Amostras geográficas, número de indivíduos (N) e número de bandas polimórficas para os quatro *primers* de ISSR investigados para *Hippocampus patagonicus* procedentes de diferentes localidades do litoral do Rio de Janeiro, Brasil.

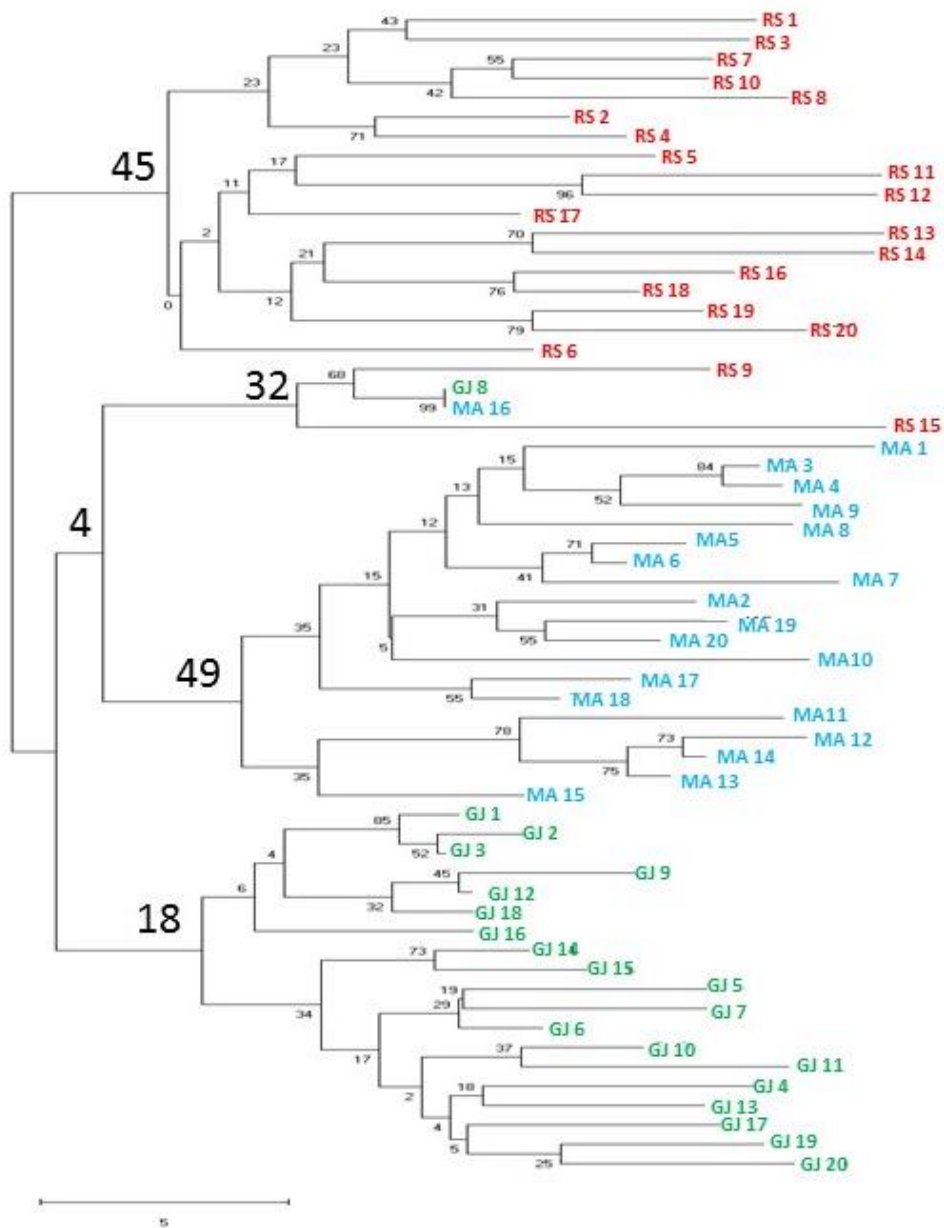
Amostras geográficas	N	Bandas polimórficas
Costa de Macaé	20	50
Da costa de Ilha Rasa até Ilha de Santana	20	66
Da costa de Joatinga até Baía de Ilha Grande	20	43

A distância genética intragrupos para as amostras do Rio de Janeiro, utilizando o número médio de diferenças, apresentou valores similares, o que também foi verificado em relação a comparação intergrupos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distância genética em *Hippocampus patagonicus* do litoral do Rio de Janeiro, Brasil, medida com quatro *primers* de ISSR. A distância genética foi calculada como a média do número de diferenças par a par. Nas células com fundo cinza está indicada a distância intrapopulacional e nas células com fundo branco a distância interpopulacional.

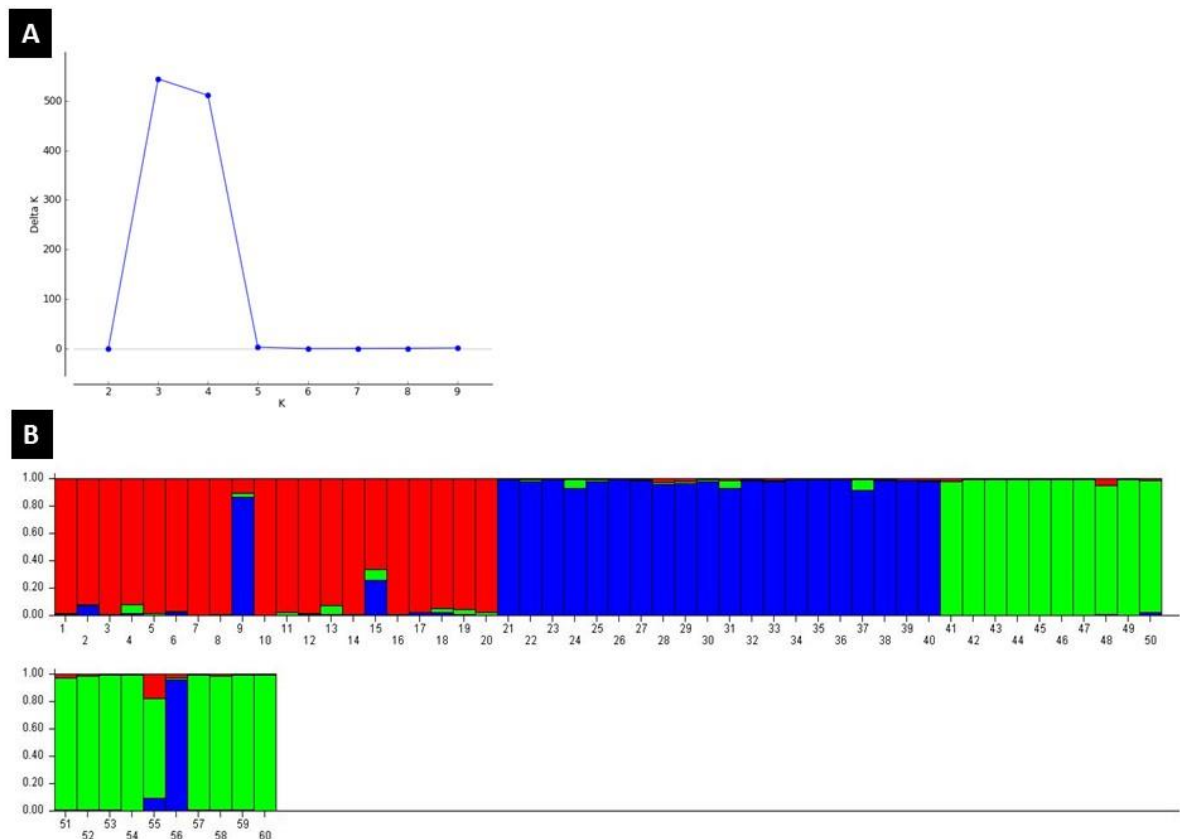
Amostras geográficas	Costa de Macaé	De costa de Ilha Rasa até Ilha de Santana	Da costa de Joatinga até Baía de Ilha Grande
Costa de Macaé	15,77	26,95	23,83
Da costa de Ilha Rasa até Ilha de Santana		15,77	26,56
Da costa de Joatinga até Baía de Ilha Grande			13,70

A análise de similaridade pelo algoritmo de Neighbor-joining e o modelo do número de diferenças separou em grupos quase monofiléticos de acordo com a origem geográfica as amostras da costa do Rio de Janeiro (Figura 4).



**Figura 4.** Árvore de Neighbor-Joining para *Hippocampus patagonicus*, construída usando o modelo número de diferenças para indivíduos coletados em diferentes regiões geográficas do Rio de Janeiro. MA= amostras de Macaé, RS= amostras desde Ilha Rasa até a Ilha de Santana e GJ= amostras de Baía de Ilha Grande e Joatinga.

Os resultados obtidos usando o STRUCTURE revelaram que o número mais provável de grupos genéticos, inferido pelo teste de Evanno, foi K=3 (Figura 5A). Esta análise definiu padrões genéticos distintos para as amostras de *H. patagonicus* procedentes das diferentes localidades geográficas investigadas (Figura 5B).



**Figura 5.** Teste de Evanno e análise Bayesiana realizada no STRUCTURE. (A) valores de  $\Delta K$  para determinar o número ideal de grupos populacionais para as amostras de *H. patagonicus* coletadas ao longo da costa do Rio de Janeiro usando quatro *primers* de ISSR. (B) Análise Bayesiana de 60 indivíduos de *H. patagonicus* para o modelo com  $K=3$ . Cada barra vertical representa um indivíduo. O comprimento de cada segmento colorido indica a proporção de um indivíduo atribuído a um grupo genético: 1–20 indivíduos capturados na costa de Macaé; 21–40 indivíduos procedentes da costa de Ilha Rasa até Ilha de Santana e 41–60 indivíduos coletados desde a costa de Joatinga até Baía de Ilha Grande

A análise de AMOVA revelou alta estruturação populacional para a espécie estudada ( $F_{st} = 34.33$ ), separando as amostras das diferentes áreas geográficas analisadas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise da variância molecular para 60 indivíduos de *Hippocampus patagonicus* coletados ao longo em três áreas geográficas na costa do Rio de Janeiro, Brasil: 1) costa de Macaé, 2) desde a costa de Ilha de Santana até Ilha Rasa e 3) desde o litoral de Joatinga até Baía de Ilha Grande, usando quatro *primers* de ISSR. GL= graus de liberdade



Agrupamento	Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componente da variância	Porcentagem de variação
Três grupos					
	Entre populações	2	190.696	4.41960	34.33
	Dentro das populações	56	473.439	8.45428	65.67

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos que *H. patagonicus* apresentou alta diversidade genética e estruturação macro e microrregional. Também verificamos que as amostras da costa do Rio de Janeiro apresentaram alta diversidade genética. Uma vez que esta espécie é classificada como vulnerável à extinção pela IUCN, sendo cavalos-marinhos que enfrentam problemas de diminuição populacional (Wei et al 2019), seria esperado que esta situação estivesse acompanhada por indivíduos com baixa diversidade genética (Frankham et al 2010). Deste modo, os resultados aqui obtidos são satisfatórios do ponto de vista da genética da conservação, pois revelam o potencial evolutivo de *H. patagonicus* e assinalam que esta é uma espécie promissora para que estratégias de manejo sejam aplicadas na sua recuperação ecológica.

A alta diversidade genética observada para o gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade 1 encontrada neste estudo é comparável com a registrada para *H. fuscus* da costa da Arábia e do Mar vermelho e *H. reidi* procedente dos Estados Unidos (Wang et al., 2019), bem como para *H. zosterae* também dos Estados Unidos (Fedrizzi et al., 2015) e para *H. guttulatus* coletados na costa europeia (Woodall et al., 2015).

Os altos valores de diversidade genética aqui obtidos pela análise de ISSR para *H. patagonicus* foram semelhantes aos encontrados, com o mesmo marcador, para amostras de *H. reidi* da costa atlântica do norte do Brasil (Montes et al., 2018)

A separação genética das amostras de *H. patagonicus* provenientes da província de Rio Negro na Argentina e do Rio Grande do Sul, Brasil daquela do Rio de Janeiro pode ser explicada pelas correntes marinhas. A Corrente Sul Equatorial (CSE) ao se aproximar do talude continental próxima à latitude 15°S bifurca-se em duas correntes de sentidos opostos, sendo que o sentido sul forma a Corrente do Brasil (CB) que margeia o continente até encontrar com a Corrente das Malvinas (CM). No Atlântico Sul forma-se um giro subtropical (GS) anticiclônico que se estende entre as coordenadas 23°S (RJ, Brasil) e 43°S (Chubut, Argentina) limitado pela CSE ao norte, pela CB a oeste, pela Corrente Sul Atlântica (CSA) ao

sul e Corrente de Benguela (CBg) ao leste (Stramma & England, 1999). As amostras de *H. patagonicus* da Argentina, Uruguai e do Rio Grande do Sul estão conectadas pela corrente das Malvinas (CM), cujo limite norte de influência ainda é desconhecido mas que, certamente, conduz os indivíduos até o giro subtropical, possibilitando a dispersão de colonizadores até o estado do Rio de Janeiro (Silveira et al. 2018). As amostras de *H. patagonicus* do Rio de Janeiro estariam influenciadas pela CB que ao margear o continente afasta-se da costa no sentido anti-horário (força de Coriolis) buscando o mar aberto (Lira et al. 2010), evitando assim que os indivíduos encontrem a população mais ao sul (sujeita ao GS) e limitando o fluxo genético.

Para outras espécies de *Hippocampus* estudos, baseados em dados genéticos, também tem indicado que as correntes marinhas seriam as responsáveis pela estruturação populacional. Este é o caso de *H. erectus* na costa Atlântica dos Estados Unidos, para a qual as correntes do Golfo e do Labrador, têm sido apontadas como possíveis ocasionadoras da estruturação populacional (Boehm et al., 2015). As correntes marinhas também explicariam as semelhanças e diferenças observadas entre populações de *H. zosterae* investigadas geneticamente na costa dos Estados Unidos (Fedrizzi et al., 2015). Da mesma forma, a estrutura genética encontrada para *H. guttulatus* também poderia ser explicada pelas correntes marinhas observadas ao longo da costa da Europa (Woodall et al., 2015).

A separação genética observada pela análise de ISSR para os indivíduos procedentes da costa do Rio de Janeiro pode ser explicada pela baixa mobilidade dos cavalos-marinhos (Foster and Vincent 2004; Qin et al. 2017), o que justificaria essa estruturação microrregional.

Os dados de COI e ISSR mostram em consonância que os indivíduos de *H. patagonicus* da costa Atlântica do Rio de Janeiro apresentam alta variabilidade genética. Esta espécie tem sido observada em alta abundância como *bycatch* durante a pesca de arrasto do camarão na costa deste estado (Silveira Rosana, comunicação pessoal). Tal situação nos leva a supor que nesta área geográfica a espécie apresenta alta densidade populacional, o que poderia explicar a elevada diversidade genética encontrada neste local (Frankham, 1996).

Este trabalho analisou populações de *H. patagonicus* do norte, centro e sul ao longo da área reconhecida para a distribuição da espécie. As análises realizadas identificaram alta diversidade genética e estruturação populacional, duas informações de alta importância para o manejo conservacionista desta espécie considerada vulnerável para a extinção. Também encontramos alta diversidade genética para as amostras procedentes da costa do Rio de Janeiro, local que representa o limite norte da distribuição geográfica de *H. patagonicus*. Este resultado indica a importância desta região para a conservação desta espécie. A diferenciação

genética de *H. patagonicus* ao longo da costa do Rio de Janeiro reflete a importância dos estudos genéticos realizados não só em escala macro, como também microrregional, denotando a importância deste tipo de análise como forma de subsidiar ações corretas de manejo voltadas a conservação de espécies que se encontram em perigo de extinção

## REFERÊNCIAS

[MMA] Ministério do Meio Ambiente. 2014. Portaria Nº445, de 17 dezembro de 2014. Pag. 128. Diário oficial da união - Seção 1, ISSN 1677-7042. Brazil.

Anderson, B. A., Carvalho-Filho, A., Morais, R. A., Nunes, L. T., Quimbayo, J. P. & Floeter S. R. (2015). Brazilian tropical fishes in their southern limit of distribution: checklist of Santa Catarina's rocky reef ichthyofauna, remarks and new records. *Check List*, DOI: <http://dx.doi.org/10.15560/11.4.1688>.

Begot, L. H., & Vianna, M. (2014) A frota pesqueira costeira do Estado do Rio De Janeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40, 79-94.

Boehm, J. T., Woodall, L., Teske, P. R., Lourie, S. A., Baldwin C., Waldman, J. & Hickerson, M. (2013). Marine dispersal and barriers drive Atlantic seahorse diversification. *Journal of Biogeography*, DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.12127>.

Boehm, J. T., Waldman, J., Robinson, J. D., & Hickerson, M. J. (2015). Population genomics reveals seahorses (*Hippocampus erectus*) of the western mid-Atlantic coast to be residents rather than vagrants. *PloS One*, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116219>.

Butchart, S. H. M., Walpole, M., Collen, B., Van, S. A., Scharlemann, J. P. W., Almond, R. E. A., Baillie, J. E. M., ... Watson, R. (2010) Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1187512>.

Cardoso, MLV (2016). Diversidade genética do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no litoral do nordeste do Brasil (dissertação mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Corander, J., Sirén, J., & Arjas, E. (2008). Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics*, 23, 111–129.

Cheng, L., Connor, T. R., Sirén, J., Aanensen, D. M. & Corander, J. (2013). Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution*, DOI: 10.1093/molbev/mst028.

Davies R. W. D., Cripps S. J., Nickson A., & Porter, G. (2009) Defining and estimating Global marine fisheries bycatch. *Marine Policy*, 33, 661-72.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. 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.

Frankham, R. (1996). Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation biology*, 10, 6, 1500-1508.

Fedrizzi, N, Stiassny, ML, Boehm, JT, Dougherty, ER., Amato, G., & Mendez, M. (2015). Population genetic structure of the dwarf seahorse (*Hippocampus zosterae*) in Florida. *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132308>.

Frankham, R, Ballou, JD & Briscoe, DA (2008). Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética.

Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2010). Introduction to Conservation Genetics. Washington, DC: Cambridge University Press.

Ferreira CB, Silveira RB (2015). Densidade populacional de cavalos-marinhos na praia da Engenhoca, Baía de Guanabara, RJ. In: **Simpósio brasileiro da fauna sobre-explotada e ameaçada de extinção (SIMBRAFAUNA)**, Ipojuca, Pernambuco, Brazil.

Foster, S.J., & Vincent, A. C. J. (2004). Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology*, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00429.x>.

González, R., Dinghi, P., Corio, C., Medina, A., Maggioni, M., Storero, L., & Gosztonyi, A. (2014). Genetic evidence and new morphometric data as essential tools to identify the Patagonian seahorse *Hippocampus patagonicus* (Pisces, Syngnathidae). *Journal of fish biology*, DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfb.12299>.

Lira, L., Wor, C., Hazin, F. H. V., Braga Júnior, H. A. C., & Santos, J. C. P. (2010). Study of marine currents by the utilization of drift cards off Pernambuco State, Brazil. *Arquivos de Ciências do Mar*, 43(1), 30 – 37.

LOURIE, SA (2004). A guide to the identification of seahorses. Project Seahorses and traffic North America. Washington, DC: University of British Columbia and World Wildlife Fund.

Luzzatto, D. C., Pujol M. J., Figueroa, D., & Astarloa, J. M. D. (2014). The presence of the seahorse *Hippocampus patagonicus* in deep waters: additional evidence of the dispersive capacity of the species. *Marine Biodiversity Records*, DOI: <https://doi.org/10.1017/S1755267214000815>.

Montes, M. A., Cardoso, M. L. V., Neves, C. H. C. B., Garcia, A. C. L., Da Silva, J. C., & Silveira, R. B. (2018). Genetic diversity and populational structure of the seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) in north-eastern Brazil: A conservationist approach. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28, 5, 1114-1122.

Peterson, R. G., & Stramma, L. (1991). Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. *Progress in Oceanography*, 26(1), 1-73.

Pereira, L. F., Silveira, R. B.; & Abilhoa, V. (2016) New records of *Hippocampus patagonicus* Piacentino & Luzzatto, 2004 (Teleostei: Syngnathidae) from the coast of Paraná, southern Brazil. *Check List*, DOI: <http://dx.doi.org/10.15560/12.1.1822>.

Piacentino, G. L. M.; & Luzzatto, D. C. (2004). *Hippocampus patagonicus* sp. nov., nuevo caballito de mar para La Argentina (Pisces, Syngnathiformes). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 6, 2, 339-349.

Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.

Qin G., Zhang Y. H., Ho A. L. F. C., Zhang, Y., & Lin, Q. (2017). Seasonal distribution and reproductive strategy of seahorses. *Ices Journal of Marine Science*, 74, 2170–2179.

Rodrigues, A. S. L., Andelman, S. J., Bakarr, M. I., Boitani, L., Brooks, T. M., Cowling, R. M., ... Yan, X. (2004). Effectiveness of the global protected area network in representing species diversity. *Nature*, 428, 6983, 640-643.

Sambrook J & Russel DW (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Spring Harbor Laboratory Press.

Schlüter P. M., & Harris, S. A. (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6, 569-572.

SILVEIRA, R. B., Barcelos, B. T., Machado, R., Oliveira, L. & Santos-Silva, J. R. (2018). Records of bycatch of *Hippocampus patagonicus* (Pisces: Syngnathidae) in commercial fishing in southern Brazil. *Revista Latino-Americana de Pesquisas Aquáticas*, 46, 4, 744-755.

Silveira, RB (2005). Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracáipe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil (tese doutorado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

Silveira, R. B., Barcelos, B. T., Silva, J. R. S., (2015) *Hippocampus patagonicus* (Syngnathidae) as bycatch in industrial fisheries in southern Brazil. I Simpósio Brasileiro da Fauna Sobre-explotada e Ameaçada de Extinção. In: Simpósio brasileiro da fauna sobre-explotada e ameaçada de extinção (SIMBRAFAUNA), Ipojuca, Pernambuco, Brazil.

Silveira, R. B., Siccha-Ramirez, R., Santos S. J. R., & Oliveira, C. (2014). Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Zootaxa*, 3861, 4, 317-332.

Stramma, L., & England, M. (1999). On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research*, 104, C9, 20863-20883.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725- 2729.

The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2017. <http://www.iucnredlist.org/> [25 de junho de 2017].

Vié, JC, Hilton-Taylor, C & Stuart, SN (2009). *Wildlife in a Changing World – An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland, CHE: The International Union for Conservation of Nature.

Vincent, Amanda C.J., Foster, S. J., Koldewey, H. J. (2011). Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. *Journal of Fish Biology*, 78, 6, 1681-1724.

Wang, X., Han, X., Zhang, Y., Liu, S., & Lin, Q. (2019). Phylogenetic analysis and genetic structure of the seahorse, *Hippocampus fuscus* from the Arabian and Red Sea based on mitochondrial DNA sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 30, 165-171.

Wei, J., Estalles, M., Pollom, R., & Luzzatto, D. 2017. *Hippocampus patagonicus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, DOI: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T195100A54909767.en>.

Woodall, L. C., Koldewey, H. J., Boehm, J. T., & Shaw, P. W. (2015). Past and present drivers of population structure in a small coastal fish, the European long snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Conservation genetics*, 16, 5, 1139-1153.

Banco de dados GenBank. 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/684179876/> [28 de novembro de 2018].

## ANEXO

### Normas para publicação no periódico:

#### ***Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems***

Edited By: Professor Philip J. Boon and Professor John M.

Baxter Impact Factor: 2.136

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 18/83 (Water Resources); 26/103 (Marine & Freshwater Biology); 90/223 (Environmental Sciences)

Online ISSN: 1099-0755

#### Author Guidelines

Please note that effective with the 2011 volume, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* has been published in an online-only format. For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Permission Request Form](#)

Author Guidelines

#### **Relevance**

You should consult the Journal's '[Aims and Scope](#)' to ensure that your paper falls within one or more of the areas published by *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **Whatever the topic, it is important that your paper explains the relevance and application of your work to the conservation and management of aquatic habitats and species.**

#### **Manuscript submission**



*Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click [ScholarOne](#) to navigate to the *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* online submission site. IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the last year it is likely that you will have had an account created.

### **All papers must be submitted via the online system**

**File Types.** Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls. **LaTeX** files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided **in addition** to the source files. Figures may be provided in .tiff or .eps format.

### **Initial Submission**

NON-LATEX USERS: Upload your manuscript files. At this stage, further source files do not need to be uploaded.

LATEX USERS: For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

### **Submission of a Revised Manuscript**

NON-LATEX USERS: Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LATEX USERS: When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your now revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded manuscripts must be deleted. If your

manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

### **OnlineOpen**

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **Copyright and Permissions**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp).

#### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [Wiley Author Services](http://www.wiley.com/author-services) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author, unless specifically requested.

### **Manuscript Style**

The language of the journal is English (spelling -- Oxford English Dictionary). All submissions must have a title and have a margin of 3 cm all round. Illustrations and tables must be on separate sheets, and not be incorporated into the text.

Manuscripts should not be written in the first person (i.e. sentences involving words such as 'we', 'us', 'our') as our journal uses third-person sentence construction: 'Samples were taken at 15 sites...' rather than 'We took samples from 15 sites...'. In *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* we reserve the use of first-person sentence construction for places where authors are voicing their opinion: e.g. 'We consider that further research is required in this area'.

The **title page** must list the full names and affiliations of all authors. The postal and email addresses, as well as the telephone and fax numbers, should only be given for the author who will check the proofs and answer any correspondence.

- The name(s) of any sponsor(s) of the research contained in the paper, along with the grant number(s) should be included in the Acknowledgements.
- Supply an **abstract** of up to 300 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work and consist of a series of short, numbered statements.
- Include 6-10 keywords underneath the Abstract, using the standard keyword list and the protocol for keyword selection given in ScholarOne.

- Divide your article into sections entitled Introduction, Methods, Results and Discussion and Acknowledgements unless the nature of the paper justifies an alternative format.

As well as full length papers, the journal also publishes short communications and brief contributions.

### **Short Communications**

Papers in this section provide authors with an opportunity to publish preliminary results of new research, or more descriptive studies where detailed data are expected later. Articles will normally cover no more than six printed pages, including an Abstract, all tables, figures, and references.

### **Commentary and Correspondence**

Papers in this section will include brief contributions on topical issues, comments on papers published in *Aquatic Conservation*, and outline descriptions of new research projects. All articles must be no longer than 1000 words, contain no abstract, figures, tables, and sub-headings, and a maximum of four references. Articles will be published at the discretion of the Chief Editors who may request revision before acceptance, but will not be subject to peer review.

### **Publication of biodiversity data**

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh ([www.freshwaterbiodiversity.eu](http://www.freshwaterbiodiversity.eu)).

### **Pre-Submission English Language Editing**

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found

at [http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english\\_language.asp](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp).

Japanese

authors can

also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

### **Reference Style**

References should be quoted in the text as name and year within brackets and listed at the end of the paper alphabetically. Where reference is made to more than one work by the same author published in the same year, identify each citation in the text as follows: (Collins, 1998a, b). Where three or more authors are listed in the reference list, please cite in the text as (Collins *et al.*, 1998). Where references are cited in the texts in groups, they should be listed in date order and not alphabetically (e.g. Harris, 1997; Thomas, 2004; Bennett, 2008). For references published online but not yet in print give the DOI where possible.

In the reference list, papers with more than 10 authors should only have the first 10 named followed by '*et al.*', unless there are 11 authors when all should be named.

When accepted for publication: Smith J. In press. Title of paper. *Name of Journal*.

For Journal articles: Rivadeneira MM, Santoro CM, Marquet PA. 2010. Reconstructing the history of human impacts on coastal biodiversity in Chile: constraints and opportunities. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystems* **20**: 74-82.

Journal Titles should

be full. For books:

Naiman RJ. 1994. *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates:

Sunderland, MA. For articles in edited volumes (e.g. books, special issues, conference proceedings):

Meyer JL, Wallace JB, 2001. Lost linkages and lotic ecology: rediscovering small streams. In *Ecology: Achievement and Challenge*, Press MC, Huntly NJ, Levin S (eds). Blackwell Scientific: Oxford; 295-317.

For reports:

Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and Wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates, and fish. US Environmental Protection Agency Office of Water, Washington, DC.

For theses

Jerling HL. 1994. Feeding ecology of mesozooplankton in the Sundays River Estuary. PhD thesis, University of Port Elizabeth, South Africa.

For European directives:

Council of the European Communities, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23rd October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* **L327**: 1-72. For software packages:

SAS. 2002. JMP version 5 statistics and graphics guide. SAS,

Cary, NC.+ For references from the World Wide Web

Scottish Natural Heritage. 2000. <http://www.snh.org.uk/> [14 June 2000]

**Illustrations**

Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

Tables should be part of the main document and should be placed after the references. If the table is created in excel the file should be uploaded separately.

**Colour Illustrations**

All figures in colour are published free of charge.

**Supporting Information**

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional: tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D

structures, and other related

nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the Acknowledgements, headed 'Supporting Information'. Short legends should be included here, listing the titles of all supporting figures, tables, data etc. Full (more detailed) legends for Supporting Information must also be uploaded as a separate Word document. This version will be used online, alongside where the Supporting Information is hosted, but not in the manuscript text, which instead uses the short versions of the legends. For image files (i.e. TIFF, JPEG etc.), legends should not be embedded. Instead, when uploading the image file to ScholarOne, please use the space provided to paste in the legend so that it appears underneath the figure in the PDF that is sent to the reviewers. In order to protect reviewer anonymity, material posted on authors' websites cannot be reviewed.

Supporting Information items should be referred to in the text as follows: Supporting figures: Figure S1, Figure S2 etc.

Supporting tables: Table S1, Table

S2 etc. Supporting data: Data S1,

Data S2 etc. Supporting

experimental procedures: Methods

S1, Methods S2 etc. Supporting

animations: Movie S1, Movie S2

etc.

Any other text-based Supporting Information: Appendix S1, Appendix S2 etc.

The above order should be used when listing the Supporting Information legends, both in the short versions in the main manuscript text file, as well as in the separate full legends file.

### **Post Acceptance**

**Further Information.** For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the submitting author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors

that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

**Authors Resources:** Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for [authors](#) and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tools

### **Cite EarlyView Articles**

To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following example:

DOI 10.1002/hep.20941, becomes <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20941>