



DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DO CAVALO-MARINHO *Hippocampus reidi* NA COSTA DO BRASIL

ADRIANO OLIVEIRA DE LIMA, ROSANA BEATRIZ SILVEIRA, ANA CRISTINA LAUER GARCIA, MARTÍN ALEJANDRO MONTES

RESUMO

As pressões antropogênicas estão elevando o risco de desaparecimento de um grande número de espécies em todo o mundo. O cavalo-marinho *Hippocampus reidi* está na categoria de “vulnerável à extinção” na costa do Brasil. Neste país, em áreas anteriormente consideradas “santuários ecológicos”, foram relatadas reduções drásticas no número de indivíduos de *H. reidi*. Por ser uma espécie de águas pouco profundas, este cavalo-marinho é altamente impactado pelas ações humanas. A fim de verificar o potencial adaptativo da espécie e de avaliar estratégias de conservação, o presente estudo investigou a diversidade e a organização genética de *H. reidi* ao longo da costa brasileira, desde o Piauí até o Rio de Janeiro. Para tal, a diversidade genética foi analisada a partir da amplificação de quatro Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em amostras do Piauí (PI, n=21), Ceará (CE, n=29), Pernambuco (PE, n=30), Bahia (BA, n=19) e Rio de Janeiro (RJ, n=31). Foram obtidos 90 fragmentos polimórficos para as os cavalos-marinhos do PI, 91 para CE, 94 para PE, 92 para BA e 98 para RJ. O número médio de fragmentos polimórficos na comparação par a par dentro das amostras geográficas foi de 17,64 para PI, 29,74 para CE, 28,80 para PE, 30,47 para BA e 30,70 para RJ. A distância genética entre os grupos, medida pela média de fragmentos polimórficos na comparação par a par, variou de 32,10 entre PI e CE a 44,15 entre BA e RJ. O dendograma, a partir do modelo do número de diferenças e a metodologia de Neighbor-Joining, revelou um clado monofilético para cada amostra geográfica. A análise molecular da variância mostrou um alto valor de diferenciação entre os grupos (29,24). A análise de Structure também demonstrou diferenciação entre as amostras geográficas. Em conjunto, os dados indicaram alta diversidade e diferenciação genética para *H. reidi*. Do ponto de vista da conservação estes resultados são animadores, pois revelam o alto potencial evolutivo da espécie na costa brasileira. Por outro lado, a alta diferenciação genética observada para as amostras geográficas indica que cada área investigada deve ser tratada como uma população distinta em estratégias de manejo.

Palavras-chave: Biologia da conservação, Genética de populações, Polimorfismo Genético, Inter Simple Sequence Repeat, Peixes

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade do planeta está sendo perdida a uma velocidade alarmante, estimativas apontam que aproximadamente 60% das espécies de vertebrados vêm apresentando intensa diminuição populacional (WWF, 2018). Esta situação atinge o ambiente marinho, no qual as mudanças climáticas, somadas à sobre pesca, têm afetado a sobrevivência de muitas espécies, levando uma grande parte delas ao perigo de extinção

ou ao completo desaparecimento (HOEGH & BRUNO, 2010; FAO, 2011).

No grupo dos peixes, os cavalos-marinhos, incluídos no gênero *Hippocampus*, apresentam mais de 80% das suas espécies ameaçadas de desaparecer (IUCN, 2018). Este é o caso de *H. reidi* que vêm sofrendo acentuadas reduções populacionais e está classificado como vulnerável à extinção pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (MMA, 2014) e como quase ameaçado nas listas de conservação internacionais (OLIVEIRA & POLLON, 2017). Esta espécie se distribui em águas estuarinas do oceano Atlântico desde a Florida, EUA até Rio Grande do Sul, Brasil (SILVEIRA et al., 2014).

Por habitar águas pouco profundas as populações de *H. reidi* têm sido muito ameaçadas por diversos tipos de ações antrópicas que colocam em risco sua persistência na natureza (ROSA ET AL., 2002; BRAGA ET AL. 2018; FRERET-MEURER ET AL., 2018). Entre estas ações está a intensa captura desta espécie para o comércio ou atividades turísticas, a pesca destes animais como fauna acompanhante - bycatch e a degradação de seus habitats naturais (LOURIE et al., 2004; SILVEIRA, 2005; ALVES et al, 2009; BARBOSA & ALVES, 2010, MONTES et al., 2018).

Uma das abordagens que contribui com o manejo de espécies em perigo de extinção é a genética da conservação. Os estudos genéticos permitem avaliar se as espécies ou populações apresentam variabilidade que permita o processo de adaptação frente às mudanças ambientais (LANDE, 1988; CARO E LAURENSEN, 1994; KELLER, 1998; BRITO E FERNÁNDEZ, 2000). Estes estudos também possibilitam investigar se existe uma organização da diversidade genética que leva a diferenciação das populações (LANDE, 1988; CARO E LAURENSEN, 1994; CAUGHLEY, 1994).

Entre as metodologias que avaliam a diversidade genética nuclear está a de Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) que se baseia na produção de fragmentos de tamanho variável utilizando primers que anelam dentro de microssatélites e amplificam a região entre essas sequências. Os primers possuem um nucleotídeo na extremidade 3'OH que anela fora do microssatélite. Mutações nestas regiões geram variação nos fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (REDDY et al., 1999; HUANG; SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001). Este marcador vem sendo utilizado para avaliar a diversidade genética e a diferenciação populacional em animais estuarinos e marinhos, contribuindo com informações para possíveis planos de manejo (GAMA-MAIA & TORRES, 2016; MONTES ET AL, 2018).

O presente trabalho visa avaliar pela metodologia de ISSR a diversidade e a organização genética de *H. reidi* a partir de amostras do Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro (Brasil). A hipótese é de que a espécie possui baixa variabilidade genética, devido à grande diminuição de indivíduos, e que a deriva genética e a seleção natural podem ter afetado a estrutura de suas populações.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Locais de coleta e procedimentos de amostragem

Amostras de *H. reidi* (Ginsburg, 1933) foram obtidas a partir de animais coletados no estuário do rio Camurupim-Cardoso (2°54'41.3''S, 41°25'42.0''W), no estado do Piauí; no estuário do rio Jaguaripe (13° 07'05''S, 38° 47'38''W), no Parque Nacional de Jericoacoara (2° 79' 10''S, 40° 47' 21''W) no estado de Ceará, no Pontal de Maracaípe (8° 54' 08''S, 35° 01' 05'') no estado de Pernambuco, no estado da Bahia e na Baía de Ilha Grande (23°8.016'S, 44°9.054'W) e Baía de Guanabara (22°49'49.1''S, 43°07'57.7''W), ambas no estado do Rio de Janeiro.

O estuário do rio Camurupim-Cardoso encontra-se na Área de Proteção Ambiental

do Delta do Parnaíba, neste local há construções e atividades pesqueiras que ameaça a conservação da biodiversidade (MAI & ROSA, 2009; IBAMA/PARNAÍBA, 2005). O parque Nacional de Jericoacoara é uma unidade de preservação federal no estado do Ceará que possui um passeio do cavalo-marinho. O pontal de Maracaípe é uma área estuarina no estado de Pernambuco que possui o passeio do cavalo-marinho. O estuário do rio Jaguaripe faz parte de uma grande unidade geoambiental de relevante significado socioeconômico para as populações do recôncavo sul da Bahia (SILVA & ESTEVAM, 2013). Nesta área há alta riqueza de peixes, porém altos níveis de impactos ambientais antrópicos (BURGER ET AL, 2011). A Baía de Ilha Grande situa-se na terceira maior ilha brasileira, em área de intensa destruição ambiental causada, em parte, pela emissão de poluentes gerados a partir dos grandes centros urbanos e industriais (ALHO ET AL, 2002; SOUZA ET AL, 2006; BELO ET AL, 2003). A baía de Guanabara é caracterizada como uma área impactada, principalmente, por efluentes domésticos da metrópole Rio de Janeiro (KJERFVE ET AL, 1997).

As amostras foram obtidas através de mergulhos em apneia, neste caso de cada animal capturado foi retirado um fragmento de 1mm x 2mm da nadadeira dorsal, sendo a amostra armazenada em um tubo com álcool absoluto e, após este processo, houve a liberação do indivíduo no mesmo local e no mesmo dia da captura. Este procedimento não afeta a sobrevivência dos animais e o fragmento retirado da nadadeira se regenera em pouco tempo. Para as coletas contamos com a autorização do SISBIO número 53582-5.

Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada com fenol-clorofórmio, utilizando o protocolo adaptado de Sambrook & Russel (2001). Durante este procedimento foram realizadas as seguintes etapas: 1) o tecido triturado foi misturado com de 500 µL de: NaCl - 5M (10 µL), Tris-HCl 10 mM (5 µL), pH 8 (5 µL), EDTA 1 mM, pH 8,0 (25 µL), SDS 10% (25 µL), H₂O destilada q.s.p (430 µL); 2) essa mistura foi incubada em banho-maria a 47°C por 1 hora e 30 minutos, 3) a seguir foi adicionada proteinase K (1:99) as amostras e retornadas por mais uma hora para o banho-maria, 4) em cada tubo foram adicionados 500µL de clorofórmio e 21µL de álcool isoamílico, homogeneizando, em seguida, essa mistura por 15 minutos com movimentos rotatórios, 5) as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, à 4°C por 30 minutos, 6) o sobrenadante foi retirado e colocado num outro tubo, procedimento feito sob luz ultravioleta, 7) aos tubos com sobrenadante foram adicionados 400µL de NaCl 1M e 800µL de etanol absoluto gelado, 8) as amostras foram novamente centrifugadas à 14.000 rpm por 25 minutos à 4°C, 9) após a centrifugação o conteúdo líquido foi descartado, mantendo-se o pellet, 10) foi acrescentado pela parede de cada tubo 375µL de etanol 70% gelado, 12) foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm à 4°C por mais 25 minutos, 13) o conteúdo líquido do tubo foi descartado, mantendo-se o pellet, 14) os tubos foram colocados para secar, 15) após foram ressuspensos com 50µL de água Mili-Q e mantidos a 4°C.

Amplificação do DNA e análise dos dados

Para a metodologia de ISSR foram utilizados os primers (AC)₆AT, (CA)₆GC, (CA)₆AG e (AGC)₄T. Estes 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.

O DNA nuclear foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers de ISSR selecionados. As reações de amplificação 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 10 X, 1 mM

de MgCl₂, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Macrogen 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 2 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 2 minutos de extensão, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com GelRed (1:500) (Biotium, Hayward, CA, USA) e separados em gel de agarose a uma concentração de 3% em tampão TBE 0,5X corridos a 110 V, 115 mA e 115 W constantes por 2h 30 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 as bandas que mostraram amplificação consistente foram consideradas. Bandas muito fracas e mal definidas foram excluídas das análises.

A partir das bandas dos géis de ISSR foram construídas tabelas binárias de presença e ausência (Microsoft Office 2007). Os resultados desta matriz foram analisados com o programa FAMD, versão 1.3 (SCHLÜTER E HARRIS 2006) para estimar o número de loci polimórficos e a presença de bandas exclusivas. Posteriormente, essa matriz de dados foi analisada através do número de diferenças na comparação entre pares de indivíduos, calculando a diferença média intra e interpopulacional. Por último foi gerado um dendograma através do algoritmo de Neighbor Joining no programa MEGA 6 (TAMURA ET AL., 2013). 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 das populações amostradas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade genética foi analisada a partir da amplificação de quatro Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em amostras do Piauí (PI, n=21), Ceará (CE, n=29), Pernambuco (PE, n=30), Bahia (BA, n=19) e Rio de Janeiro (RJ, n=31). Foram obtidos 90 fragmentos polimórficos para as os cavalos-marinhos do PI, 91 para CE, 94 para PE, 92 para BA e 98 para RJ.

O número médio de fragmentos polimórficos na comparação par a par dentro das amostras geográficas foi de 17,64 para PI, 29,74 para CE, 28,80 para PE, 30,47 para BA e 30,70 para RJ.

A distância genética entre os grupos, medida pela média de fragmentos polimórficos na comparação par a par, variou de 32,10 entre PI e CE a 44,15 entre BA e RJ. O dendograma, a partir do modelo do número de diferenças e a metodologia de Neighbor-Joining, revelou um clado monofilético para cada amostra geográfica. A análise molecular da variância mostrou um alto valor de diferenciação entre os grupos (29,24). A análise de Structure também demonstrou diferenciação entre as amostras geográficas.

No presente estudo foi observada maior variabilidade genética para os indivíduos de *H. reidi* provenientes do estado do Rio de Janeiro, seguida por os indivíduos da Bahia, Ceará e Pernambuco e baixo quando comparados com as amostras do Piauí.

Montes et al (2018), utilizando os mesmos primers de ISSR aqui empregados, em um estudo realizado com *H. reidi* de Pernambuco e do Ceará, também observaram valores variáveis de diversidade genética. O maior valor de diversidade genética obtido por esses autores foi quase 20% menor em comparação com o maior valor registrado no nosso estudo. Os valores inferiores intrapopulacionais aqui registrados foram semelhantes aos documentados por Montes et al (2018). Assim, estes estudos sinalizam que *H. reidi*

apresenta altos valores de variabilidade genética, com populações com bom potencial evolutivo. Espécie de cavalo-marinho, *H. fuscus* (n = 36), provenientes do Mar Vermelho e do Mar da Árabia quando comparadas a espécie *H. reidi* (n=26) da Flórida, demonstrou uma diversidade genética maior, sendo, *H. fuscus* geneticamente próximo ao *H. reidi*, cerca de 98% de semelhança, (WANG et al, 2018). O tamanho amostral utilizado no trabalho de Wang (2018) é menor do que o registrado no presente trabalho.

4 CONCLUSÃO

Hippocampus reidi apresenta alta variabilidade genética e alta estruturação genética. Devido a estes resultados, observamos que os programas de conservação podem ser bem sucedidos se levam em consideração a estruturação genética para recuperar as populações

REFERÊNCIAS

- ALHO, C.J.R.; SCHNEIDER, M. & VASCONCELLOS, L.A. 2002. Degree of threat to the biological diversity in the Ilha Grande State Park (RJ) and Guidelines for conservation. Brazilian Journal Biology. 62(3): 375-385.
- ALVES, R.R.N.; NETO, N.A.L.; BROOKS, S.E.; ALBUQUERQUE, U.P. 2009. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of Northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 124: 600-608.
- BARBOSA, J.A.A.; ALVES, R.R.N. 2010. “Um chá de que?” – Animais utilizados no preparo tradicional de bebidas medicinais no Agreste Paraibano. Revista de Biologia e Farmácia. Vol.04, n. 02.
- BELO, W.C.; DIAS, G.T.M. & DIAS, M.S. 2003. O fundo marinho da Baía da Ilha Grande, RJ: o relevo submarino e a sedimentação no canal central. Revista Brasileira de Geofísica, Vol. 20 (1).
- BRAGA, H.O.; PARDAL, M.A.; DA CRUZ, R.C.M.; ALVARENGA, T.C. & AZEITEIRO, U.M. 2018. Fishers’ knowledge in Southeast Brazil. The case of study of the Brazilian sardine. Ocean & Coastal Management, 165, 141-153.
- BRITO, D. & F.A.S. FERNANDEZ. 2000. Dealing with extinction is forever: understanding the risks faced by small populations. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science 52: 161-170.
- BURGER, R.; ZANATA, A.M. & CAMELIER, P. 2011. Estudo taxonômico da ictiofauna de água doce da bacia do Recôncavo Sul, Bahia, Brasil. Biota Neotropica 11(4).
- CARO, T.M.; LAURENSEN, M.K. 1994. Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. Science 263: 485-486.
- CAUGHLEY, G. 1994. Directions in conservation biology. Journal Animal Ecology. 63:215- 244.

DESHPANDE, K. U; APTE, G. S; BAHULIKAR, R. A; LAGU, M. D; KULKARNI, B.O; SURESH, H. S; SINGH, N. P; RAO, M. K; GUPTA, V. S; PANT, A; RENJEKAR, P.K. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the Western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. *Molecular Ecology*. Blackwell Science Ltd, 2001. Vol.10: 2397-2408 p.

FAO. Review of the state of world marine fisheries resources. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 569. Rome, FAO. 2011. 334 pp.
(<http://www.fao.org/docrep/015/i2389e/i2389e.pdf>).

FRERET-MEURER, N.V.; ANDREATA, J.V. 2008. Field studies of a Brazilian Seahorse population, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 51, n. 4, pp.:743-751.

FRERET-MEURER, N.V.; FERNÁNDEZ, T.; OKADA, N. & VACCANI, A. 2018.

Population dynamics of the endangered seahorse *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933) in a tropical rocky reef habitat. *Population*, 41, 345 – 356.

HAZIN, F.H.V.; WOR, C.; OLIVEIRA, J.E.L.; HAMILTON, S.; TRAVASSOS, P; & GEBER, F. Resultados obtidos por meio do fundeio de um correntógrafo na plataforma continental do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. 2008. *Arquivo de Ciências do Mar*, 41 (1): 30-35.

HOEGH-GULDBERG, O. & BRUNO, J.F. 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328 (5985), 1523-1524.

HUANG, J. C; SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea series* Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor Appl Genet*. University of Hong Kong: Hong Kong, 2000. Vol.100. 1050 –1060 p.

Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. 2005. Proposta de criação de uma unidade de conservação de proteção integral na zona costeira dos estados do Piauí e Cearpa. IBAMA, Parnaíba, p.1-32.

[IUCN] International Union for Conservation of Nature. 2016.
<http://www.iucnredlist.org/details/10082/0> [30 de outubro de 2018].

KELLER, L. 1998. Inbreeding and its fitness effects in an insular population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution*, 52, 240-250.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C.H.A.; DIAS, G.T.M.; FILIPPO, A.M. & QUARESMA, V.S. 1997. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*, Vol. 17, Nº13, p. 1609-1643.

LANDE, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460. LOURIE, S.A. et al. A Guide to the Identification of Seahorses, Project Seahorse and Traffix North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund. 2004.

- MAI, A.C.G. & ROSA E.M.L. 2009. Aspectos ecológicos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no estuário Camurupim/Cardoso, Piauí, Brasil, fornecendo subsídios para a criação de uma Área de Proteção Integral. *Biota Neotropica*. Vol.9, n.3. p p.85-91
- MONTES, M.A.; CARDOSO, M.L.V.; NEVES, C.H.C.B.; GARCIA, A.C.L.; 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 Freshwater Ecosystem*; 1-9.
- OKADA, N.B.; CARMO, A.V. & FRERET-MEURER, N.V. 2015. Caracterização do padrão de distribuição do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 em nove praias do litoral do estado do Rio de Janeiro. *Revista BioUSU*; v. 1; n.1.
- OLIVEIRA, V.M. & FRERET-MEURER, N.V. 2012. Distribuição vertical do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 na região de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Biotemas*, 25 (2), 59-66. junho de 2012.
- OLIVEIRA, T. & POLLOM, R. 2017. *Hippocampus reidi*, The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T10082A17025021. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T10082A17025021.en>. Acesso em: 01 de dezembro de 2018.
- REDDY K.D; NAGARAJU J; ABRAHAM E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR) anchored PCR. *Heredity. The Genetical Society of Great Britain*, 1999. Vol. 83. p.: 681–687.
- ROSA, I. M. L., DIAS, T. L., BAUM, J. K., 2002. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). *Environmental Biology of Fishes*, 64: 738.
- ROSA ET AL. 2007. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). *Sociedade Brasileira de Ictiologia. Neotropical Ichthyology*, 5(3): 405-414.
- SILVEIRA, R. B. 2000. Comportamento reprodutivo e desenvolvimento inicial de *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 em laboratório. *Biociências*, v. 8, n. 1, p. 115-122.
- SILVEIRA, R.S. 2005. Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracápe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. Tese de doutorado. Porto Alegre – RS, Brasil.
- SILVEIRA, R.B.; SICCHA-RAMIREZ, R.; SILVA, J.R. & OLIVEIRA, C. 2014. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus species* (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Zootaxa*, 3861, 317-332.
- SOUZA, P.A.; MELLO, W.Z. & MALDONADO, J. 2006. Composição química da chuva e aporte atmosférico na Ilha Grande, RJ. *Química Nova*. Vol. 29, Nº 3, 471 -476.
- SCHLÜTER, P.M. & HARRIS, S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569–572.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETEROSN, D.; FILIPSKI A. & KUMAR, S. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.

VALENTINI, E. & MUEHE, D. 1998. O litoral do Rio de Janeiro: uma caracterização física- ambiental. *FEMAR*, p.:123.

WANG, X.; HAN, X.; ZHANG, Y; LIU S. & LIN Q. Phylogenetic analysis and genetic structure of the seahorse, *Hippocampus fuscus* from the Arabian and Red Sea Based on mitochondrial DNA sequences. 2018.

Mitochondrial DNA Part A – DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. WOODWALL, L.C.; OTERO-FERRER, F.; CORREIA, M.; CURTIS, J.M.R.; GARRICK-MALDMENT, N.; SHAW, P.W. & KOLDEWEY, H.J. 2017. A synthesis of European seahorse taxonomy, population structure, and habitat use as a basis for assessment, monitoring and conservation. *Marine Biology*, 165:19.

WWF. 2018. Informe Planeta Vivo - 2018: Apuntando más alto. Grooten, M. y Almond, R.E.A.(Eds). WWF, Gland, Suiza. XU, T.; SUN, J.; WATANABE, H.K.; CHEN, C.; NAKAMURA, M.; JI, R.; FENG, D.; LV, S.; BAO, Z.; QIAN, P-Y & QIU, J-W. Population genetic structure of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* (Bivalvia: *Mytilidae*) in the Northwest Pacific.