

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**PADRÕES DE USO DO HABITAT E
ESTRUTURA GENÉTICA DE
LYCENGRAULIS GROSSIDENS
(AGASSIZ, 1829) (TELEOSTEI,
ENGRAULIDIDAE)**

ANA CECILIA GIACOMETTI MAI

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal do
Rio Grande, como requisito parcial à
obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. João Paes Vieira

**RIO GRANDE
Dezembro, 2013**

*À minha família, especialmente à Daniel
Loebmann pelos últimos dez anos de
companheirismo e pesquisa*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João P. Vieira, meu eterno orientador, me guiando desde minha graduação. Sempre disposto a ir a campo, conseguir material, recursos financeiros e ler, mais uma versão de um artigo. E, é claro, soltar uma “clássica” frase do Mano Lima para tomarmos de inspiração: *“Pato galinha e marreco inté esse inseto eu deixei com ela”*

Ao Dr. Cristiano Q. Albuquerque e MSc. Mario V. Conдини pela ajuda fundamental no estudo dos elementos químicos dos otólitos.

Ao Prof. Dr. Luis F. Fernandes Marins, e Profas. Dras. Lizandra J. Robe e Carolina Miño pela disponibilidade de espaço e tempo para as questões moleculares desta tese e de projetos paralelos.

Aos Profs. Drs. Alexandre Garcia, Henrique Muelbert pela paciência, conselhos nas diferentes etapas do meu doutoramento. MUITÍSSIMO obrigado! Obrigado também, aos Profs. Drs. Nelson Fontoura, Luis F. F. Marins e Lizandra J. Robe por participarem como banca examinadora desta tese.

A todos meus amigos do laboratório de Ictiologia e Biologia Molecular (FURG) pelas conversas e reflexões de corredores e na salinha do café.

Aos amigos da pós-graduação em Oceanografia Biológica da FURG, tenho aqui que quebrar a minha vontade de não citar nomes, para poder agradecer especialmente a Vera, secretária da “pós” e ao Votto e Bruno, secretários do IO, que nunca mediram esforços para me ajudarem. Ainda dentro deste grupo seletto, gostaria de deixar aqui registrados os amigos do curso, que estão muito presentes em minha vida, André, Cindy, Daiane,

Gabriela, Gabriel, Lumi, Maurício, Paula, Renata, Rodrigo, Suzana, Valéria e Vitta, com os quais adoro falar de “ciência” e assuntos diversos.

Impossível também não citar os parceiros dessa jornada, que perseguiram as manjubas, pelos quatro cantos deste continente, Dra. Alicia Acunã, Dra. Débora Troca, Dr. Fabio L. Rodrigues, Dr. Francisco Miguel Barbará González, Dr. Leonardo Moraes, Dr. Marcelo Nóbrega, Dr. Nelson Fontoura, Luis Gustavo Cardoso, Thiago Silva, Gilson, Mauro Oliveira, Malu Claudino e Alexandra Costa.

As agências financiadoras CNPq pela bolsa (CNPq, Proc. 870594/1997-4), projeto PELD (Pesquisas Ecológicas de Longa Duração, Proc. 403805/2012-0), SISBIOTA (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade; CNPq-FAPERGS, Proc. 563263/2010-5), Tainha I, II e III (CNPq-Universal). A FURG pela acolhida, infra-estrutura, servidores e apoio a publicação.

Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Muito obrigada a todos

SUMÁRIO

RESUMO	1
Palavras chave	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
OBJETIVOS	10
HIPÓTESES.....	11
MATERIAL E MÉTODOS GERAL	12
Área de estudo.....	12
Amostragem do material biológico	14
SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	14
CAPÍTULO 1	15
Revisão e considerações sobre o uso do habitat, distribuição e história de vida de <i>Lycengraulis grossidens</i>	15
CAPÍTULO 2	18
Alta plasticidade no uso do habitat apresentado por <i>Lycengraulis grossidens</i>	18
CAPÍTULO 3	22
Isolamento e caracterização de 18 microssatélites para <i>Lycengraulis grossidens</i> ...	22
CAPÍTULO 4	24
Estruturação genética de <i>Lycengraulis grossidens</i> (Clupeiformes) do sul do Brasil à Argentina: O papel do gradiente de salinidade.	24
CONCLUSÕES GERAIS DA TESE	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
Anexo I.....	68
Anexo II.....	79
Anexo III.....	108

RESUMO

Lycengraulis grossidens pode ser considerada uma espécie enigmática em relação ao uso do habitat, sendo classificada desde anádroma até catádroma. Através de uma abordagem multi-integrada, envolvendo análise de dados bibliográficos, uso de ferramentas moleculares e estudo de elementos químicos do otólito a presente tese tenta elucidar algumas questões importantes sobre sua bio-ecologia. Desta forma esta tese é constituída de quatro capítulos. O primeiro capítulo (publicado) consiste em uma revisão sobre o uso do habitat, distribuição e história de vida (Mai & Vieira 2013. Review and consideration on *L. grossidens*. Biota Neotrop 13: 121-130). O segundo capítulo (submetido à Estuarine, Coastal and Shelf Science) trata do padrão de uso do habitat revelado por análises químicas dos otólitos (Mai, Albuquerque, Vieira et al. High plasticity in habitat use of *L. grossidens*). O terceiro capítulo (publicado) é um trabalho técnico-científico onde foram isoladas e caracterizadas regiões microssatélites de *L. grossidens* (Mai, Vieira, Marins et al. 2013. Isolation and characterization of 18 microsatellites for *L. grossidens*. Cons Gen Res 5: 15-18). O último capítulo (inédito) descreve um estudo de genética populacional, baseado na região controle do DNA mitocondrial de *L. grossidens*, utilizando exemplares da porção sul de sua distribuição. Os resultados gerais sugerem que *L. grossidens* é capaz de se reproduzir em água doce ou salobra, com uma alta plasticidade no uso do habitat, apresentando migração parcial, com contingentes diádromo/nômades e residentes no mesmo local. A espécie apresenta um padrão clinal no comportamento migratório, com maior percentual de diádromo/nômades em altas latitudes. Estas análises confirmaram, também, a presença de uma população residente de água doce no Rio Uruguai, e de um contingente residente na Lagoa Mirim. Análises de distância genética, baseadas na região controle do DNA mitocondrial, indicam que a população límnic do Rio Uruguai encontra-se semi-isolada, e tem recebido diversos pulsos de entrada de indivíduos através do Rio da Prata ao longo dos últimos 137 mil anos. Nos demais locais foi encontrado um elevado fluxo genético, sugerindo que se trata de uma população panmítica.

Palavras chave: ecologia, uso do habitat, química de otólitos, genética de populações, isolamento populacional.

ABSTRACT

Lycengraulis grossidens is widely distributed in the coastal zone of Atlantic Southwest and has been considered as an enigmatic species regarding its habitat use, being classified from anadromous to catadromous. Through a multi-integrative approach involving analyses of bibliographic data, molecular tools and otolith chemistry this thesis attempts to clarify some important issues about the bioecology of *L. grossidens*. This thesis consists of four chapters: The first chapter (published) consists in a review (Vieira & Mai 2013. Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *L. grossidens*. Biota Neotrop 13: 121-130). The second chapter (submitted to Estuarine, Coastal and Shelf Science) investigated the plasticity on habitat use of *L. grossidens* throughout chemical analyses of otoliths (Mai, Albuquerque, Vieira et al. High plasticity in habitat use of *L. grossidens*). The third chapter (published) is a technical-scientific (Mai, Vieira, Marins et al. 2013. Isolation and characterization of 18 microsatellites for *L. grossidens*. Cons Gen Res 5: 15-18). The last chapter (unpublished) describe the population genetics of *L. grossidens* based on control region of mitochondrial DNA using individuals of the southern portion of its distribution. Results suggest that the species is able to breed in fresh or brackish water, with a high plasticity in habitat use, with contingent diadromous/nomadic and resident cohabiting in the same areas. It was revealed a clinal pattern in migratory behavior of the species, with the highest percentage of diadromous/nomadic at high latitudes. These analyses confirmed the presence of a resident population in the Uruguay River, and a contingent resident in Mirim Lagoon. A high genetic diversity was found in the control region of *L. grossidens*. The genetic diversity of samples from Mirim, Cassino, Mampituba, Patos Lagoon and La Plata suggests high gene flow among those areas, suggesting the presence of a panmitic population. Genetic distance analyzes indicate that the population of the Uruguay River is currently semi-isolated and had several pulses of invasion in the past 137 kyears of individuals belong from the mouth of the La Plata River.

Key words: fish ecology, habitat use, otolith chemistry, population genetic, landlocked.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Engraulididae é primordialmente marinha, vivendo em águas costeiras de todos os mares entre as latitudes de 60°N e 50°S, com poucas espécies sendo capazes de viverem ou usarem a água doce. Esta família compreende 16 gêneros, com aproximadamente 140 espécies descritas. Estudos indicam que pelo menos cinco linhagens surgiram na água doce, são elas: *Lycengraulis*, *Amazonsprattus*, *Anchoviella*, *Jurengraulis* e *Pterengraulis* (Bloom & Lovejoy 2012).

O arranjo molecular filogenético atual reconhece que os Engraulididae de água doce da América do Sul são produto de uma transição do ambiente marinho para o de água doce ocorrida no Mioceno (Albert & Reis 2011). Nesta visão, o gênero *Lycengraulis* surgiu na água doce (na bacia amazônica), sendo que dentre as espécies viventes *Lycengraulis batesii* é considerada a espécie basal, enquanto *L. poeyi* e *L. grossidens* derivaram mais recentemente e retornaram ao ambiente marinho (Bloom & Lovejoy 2012).

A distribuição geográfica atual de *L. grossidens* demonstra sua capacidade eurialina, sendo encontrada desde ambientes costeiros marinhos até ambientes límnicos (Mai & Vieira 2013). A espécie ocorre da América Central (Belize) até a região da Patagônia (Argentina), podendo ser encontrada em grandes bacias hidrográficas (p. ex., Amazonas e Paraná), além de pequenos rios ao longo da costa (Froese & Pauly 2013).

Os biomas marinhos e de água doce são geralmente tratados como regiões zoogeográficas distintas (Darlington 1957). O movimento de organismos entre estes biomas é dificultado devido a fatores iônicos e osmorregulatórios inerentes a fisiologia. Existem poucos organismos capazes

de se moverem entre eles, havendo uma mudança pronunciada da composição faunística entre o mar, os estuários e os ambientes de água doce (Winemiller & Leslie 1992, Blaber 2000).

As classificações dos organismos quanto ao uso dos habitats vêm sofrendo ampla revisão (Elliott et al. 2011, Potter et al. 2013). Inicialmente, espécies que realizam migrações em gradientes salinos, eram classificadas como diádromas, sendo subdividida em catadrómas, anádromas e anfídromas (McDowall 1999). Organismos anádromos migram do mar para desovar em água doce, e seus filhotes retornam ao mar para se alimentar, crescer e maturar sexualmente – são exemplos desse comportamento muitos salmões, esturjões e lampréias; catádromos são organismos que desovam no mar, se movendo para a água doce como pequenos juvenis para se alimentar, crescer e maturar sexualmente, retornando ao mar como adultos, para se reproduzirem – como ocorre em enguias; anfídromos se reproduzem em água doce, vão para o mar como larvas, para um período de alimentação e crescimento, usualmente por poucos meses, retornando a água doce ainda como juvenis, para mais um período de alimentação e crescimento em água doce, seguido pela reprodução, isto ocorre em alguns Gobiidae (McDowall 2007).

Com os avanços dos estudos na compreensão do uso do habitat, muitas vezes refinados utilizando ferramentas como marcação e recaptura, telemetria e principalmente microelementos em otólitos, essas três classificações não comportavam mais a complexidade de comportamentos encontrados. Sendo assim, novas categorias foram sendo criadas, e atualmente temos 13 diferentes categorias para o comportamento de uso do habitat em um gradiente salino (Potter et al. 2013) (Fig. 1).

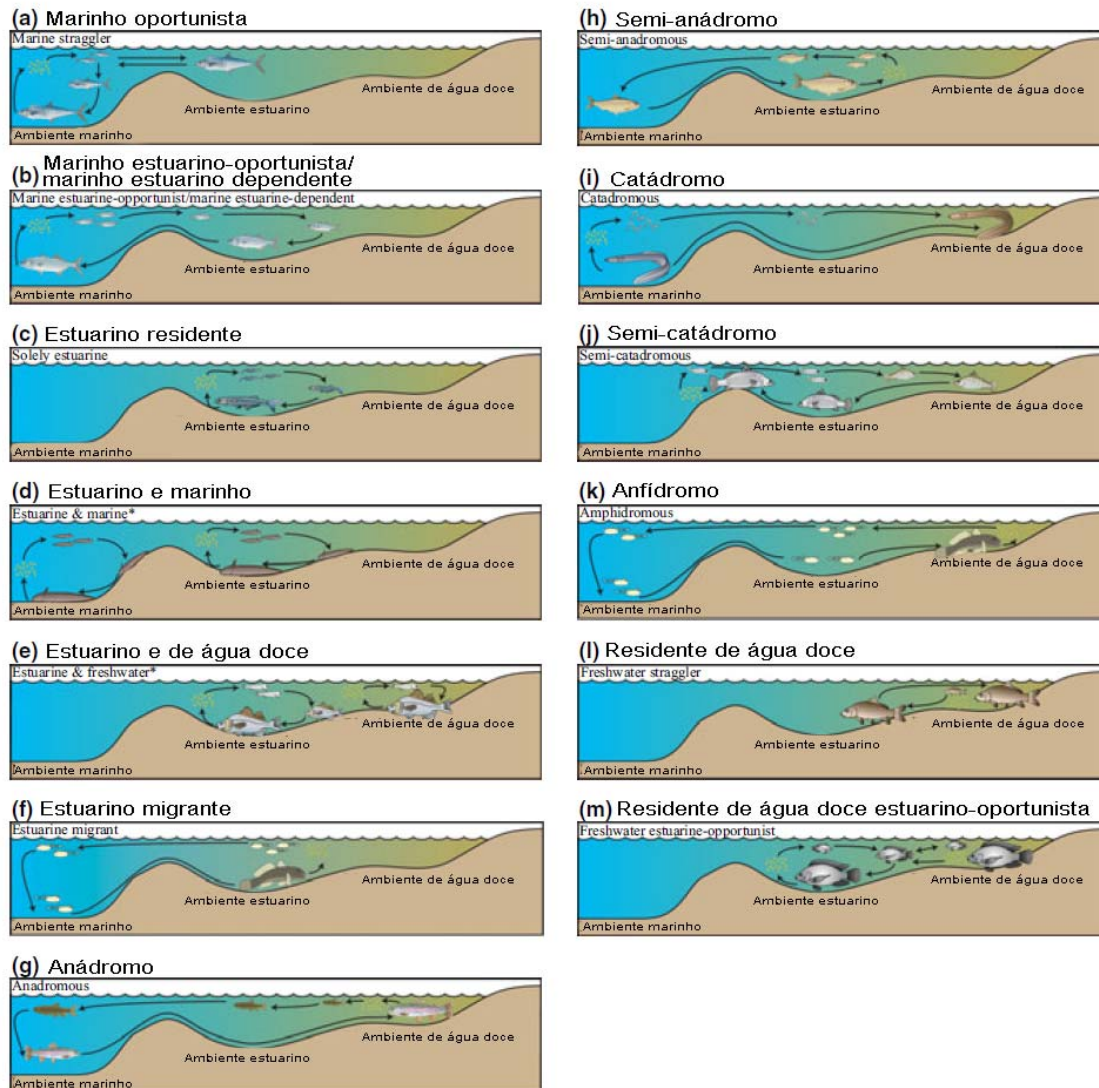


Fig. 1. Propostas de classificação dos organismos quanto ao uso do habitat em gradientes salinos (adaptado de Potter et al. 2013).

Aliado a esta complexidade, outro comportamento que vem sendo observado com frequência, em diversas espécies de peixes, é a migração parcial, onde parte da população realiza algum tipo de diadromia, mas outra parte é residente (Chapman et al. 2012). Então, uma população pode estar dividida em distintos contingentes (grupo de indivíduos que possuem comportamento similar) (Jonsson and Jonsson 1993, Secor 1999), o que

dificulta ainda mais o enquadramento de uma espécie nas categorias propostas até o momento.

O uso do habitat por *L. grossidens* sempre foi um tema controverso entre os pesquisadores. Estudos realizados entre o norte, nordeste e sudeste do Brasil classificam a espécie principalmente como marinhas migrantes (Krumme et al. 2004, Vasconcelo-Filho & Oliveira 1999, Reis-Filho et al. 2010, Sánchez-Botero et al. 2008, Vilar et al. 2011). Na Lagoa dos Patos, a espécie já foi classificada como estuarina residente, marinha migrante, catádroma e semi-catádroma (Weiss & Krug 1977, Weiss 1981, Chao et al. 1985, Garcia et al. 2003, Ramos 2005, Vieira et al. 2010). Pesquisadores da Bacia do Rio da Prata (Argentina) classificam a espécie como um peixe migrador do tipo anádromo (Mastrarrigo 1947, Fuster de Plaza & Boschi 1961). Todavia, outros estudos sugerem a presença de populações restritas a água doce (Lucena et al. 1994, Benedito-Cecilio et al. 1997, Goulart et al. 2007).

Mudanças intraespecíficas no uso dos habitats estuarinos podem ocorrer ao longo de um gradiente latitudinal/longitudinal de distribuição (Elliott et al. 2007, Whitfield et al. 2012). Atualmente, além de estudos de padrão de abundância e frequência das espécies, outras ferramentas vêm sendo utilizadas para compreender e caracterizar o comportamento de movimento dos organismos. Uma ferramenta que tem se demonstrado efetiva para a reconstrução do passado ambiental dos peixes, são as análises de elementos químicos dos otólitos. Este tipo de estudo tem a vantagem de que todos os indivíduos encontram-se “marcados”. Isto é possível porque, à medida que o animal cresce, carbonato de cálcio, otolina e micro-elementos presentes no ambiente são depositados de forma concêntrica nos otólitos. Sendo assim, os

otólitos além de marcarem o tempo de vida, registram informações químicas relativas ao meio ambiente em que o indivíduo vive (Campana & Neilson 1985, Arai et al. 2007).

Vários elementos químicos presentes na composição do otólito têm sido quantificados com distintos objetivos (Elsdon et al. 2008). Estudos que visam traçar o uso do habitat de espécies que transitam entre ambientes de água doce e salgada baseiam-se, principalmente, nas razões dos elementos estrôncio (Sr) e bário (Ba) em relação ao cálcio (Ca). Isso se deve ao fato de que o Sr é um elemento que existe em maiores concentrações em águas salgadas, enquanto o Ba é predominante em ambientes de águas doce (Vries et al. 2005, Arai et al. 2007). Sendo assim, é esperado que a concentração de Sr seja maior nas camadas do otólito referentes ao período que o indivíduo estava em água salgada e a concentração de Ba seja maior nas camadas do otólito referentes ao período que o indivíduo estava em água doce.

O isolamento de parte de uma população em ambiente de água doce pode ser investigado de diferentes formas, como por exemplo, estudos morfológicos, comportamentais, de parâmetros populacionais, elementos químicos em otólitos e/ou moleculares. Os marcadores genéticos somados a elementos químicos de otólitos para inferir a conectividade das populações foram as ferramentas escolhidas neste estudo. De maneira geral, os marcadores moleculares podem ser agrupados em duas categorias: os marcadores de frequência e marcadores de sequência (Hellberg 2009). Os primeiros utilizam as frequências de alelos para sugerir fluxo gênico entre populações, e as regiões do DNA nuclear, conhecidas como microssatélites, são as mais utilizadas recentemente. Marcadores de sequência, em contraste,

utilizam a distribuição de haplótipos para inferir relações entre populações, sendo para tal fim, utilizado geralmente sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) (Allendorf & Luikart 2007).

As mudanças genéticas que os marcadores de frequência e sequência podem revelar ocorrem em diferentes escalas de tempo. Marcadores de frequência são adequados para prazos mais curtos (por exemplo, respostas ecológicas às mudanças antrópicas) (O'Reilly & Wright 1995, Zane et al. 2002). Já as sequências do mtDNA, possuem taxas de mutações mais lentas, variando de região para região (por exemplo, a região do mtDNA conhecida do Citocromo Oxidase I (COI) é utilizada para identificação de espécies, também conhecida como código de barras (DNA barcoding) (Tautz et al. 2003, Ward et al. 2008). Portanto, a escolha do marcador genético a ser utilizado depende do tipo de pergunta que se pretende responder.

No caso de populações que podem estar sofrendo isolamento por barreiras artificiais (p. ex. Lagoa Mirim, pela Barragem Eclusa do Canal São Gonçalo e, Rio Uruguai, pela Barragem Eclusa de Salto), marcadores de frequência, como os microssatélites, são os mais indicados, pois estas barragens estão construídas há menos de 40 anos.

A presente tese surgiu da ideia de que o isolamento de *L. grossidens* em ambientes de água doce fosse causado pelas barragens. Assim, além do estudo de elementos químicos em otólitos, foi desenvolvida uma biblioteca genômica de fragmentos de microssatélites. Os resultados iniciais, todavia, demonstraram que o isolamento das populações de água doce poderiam ser anteriores a construção das barragens, dentro de uma escala de tempo de milhares de anos. Por essa razão, optou-se pelo estudo de um marcador de

sequência, a região controle do DNA mitocondrial, também conhecida como D-loop.

A região controle é uma região não codificadora do DNA mitocondrial, e tem sido intensamente utilizada para investigar a estruturação genética “recente”, relacionadas à espécies e à populações (Avice 1994, Tabata & Taniguchi 2000). Esta região possui uma taxa mutacional de 5-20% a cada 1.000.000 anos para peixes marinhos (Liu et al. 2006).

No caso de existirem populações residentes de água doce no Rio Paraná e Uruguai, Bacia do Paraná, no sistema Patos/Mirim e Rosário de Lagoas, Bacia Atlântico Sul, quais as rotas de colonização desses ambientes? Aqui dois cenários poderiam ter ocorrido, um via conexão entre bacias hidrográficas durante eventos isostáticos do continente sul americano, somados a regressões e transgressões do nível do mar. Este cenário parece ser o que melhor explica a presença de *Plagioscion* (Sciaenidae) e raias-de-água-doce *Potamotrygon* (Potamotrygonidae) tanto na Bacia Amazônica como na Bacia do Paraná (Bloom & Lovejoy 2011, Cooke et al. 2012). Estes dois gêneros só ocorrem em ambientes de água doce, e há indícios de que o gênero *Plagioscion* surgiu há mais de 10 milhões de anos, quando as bacias estavam conectadas (Cooke et al. 2012).

A outra rota seria via conexões do ambiente marinho com o de água doce. Já que *L. grossidens* ocorre em parte da costa leste da América do Sul, e utiliza ambientes estuarinos e de água doce por toda sua distribuição. Tendo ainda registros em ambientes semi-isolados, como na Lagoa Peri, SC, Rosário de Lagoas, Lagoa Mirim e Rio Uruguai, RS.

OBJETIVOS

Esta tese teve como principais objetivos:

- i) realizar uma ampla revisão da literatura, e condensar o maior número de informações sobre a espécie em um único trabalho;
- ii) investigar o padrão de uso do habitat de *Lycengraulis grossidens* em diversos pontos da costa da América do Sul;
- iii) verificar, com análises de elementos químicos em otólitos, se há isolamento atual das populações do Rio Uruguai e da Lagoa Mirim;
- iv) desenvolver um estudo de estruturação genética desde Santa Catarina até a Argentina, incluindo pontos amostrais em ambientes de água doce;
- v) avaliar se a rota de colonização em água doce ocorreu via conexões de bacias hidrográficas ou via marinha.

HIPÓTESES

Considerando o contexto e as informações acima expostas, as hipóteses de trabalho foram:

Hipótese 1: *Lycengraulis grossidens* é uma espécie com alta plasticidade no seu ciclo de vida quanto ao uso do habitat.

A existência de informações contraditórias sobre seu padrão de uso do habitat ao longo do ciclo de vida pode ser explicada pela capacidade da espécie em se reproduzir tanto em água salobra como doce.

Hipótese 2: As populações límnicas da Lagoa Mirim e do Rio Uruguai estão isoladas das populações costeiras do sul do Brasil, Uruguai e Argentina.

A grande dúvida é se as barragens artificiais impedem a migração e isolam as populações atuais de água doce ou se estas populações já estavam isoladas antes da construção das barragens.

Hipótese 3: *Lycengraulis grossidens* apresenta uma só população na porção costeira, desde Santa Catarina, no Brasil, até Mar del Plata, na Argentina.

Apesar das diferenças morfoméricas encontradas ao longo do litoral do Brasil, a população IV - Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Silva 2006) não apresentaria diferenças genéticas em relação a sua distribuição mais ao sul.

Hipótese 4: A rota de colonização de *L. grossidens* para os ambientes límnicos é marinha via ambientes estuarinos ao longo da costa.

Para Sciaenidae de água doce, a rota de colonização recentemente proposta ocorre via interconexão das bacias do Amazonas e do Paraná (Cooke et al. 2012). Porém esta rota não é a mais provável no caso dos *Lycengraulis*.

MATERIAL E MÉTODOS GERAL

Área de estudo

A área amostrada estendeu-se de Pernambuco (7°54'S) (Brasil) a Mar del Plata (Argentina) (36°21'S). Espécimes foram obtidos de ambientes límnicos (Lagoa Mirim, Santa Vitória do Palmar, RS e Rio Uruguai (Uruguaiana, RS); estuarinos (Rio da Prata, Mar del Plata, Argentina e Maldonado, Uruguai, Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS, Rio Mampituba, Passo de Torres, RS e Ribeira, Iguape, SP); marinhos (Praia do Cassino, Rio Grande, RS, Baía de Todos os Santos, Salvador, BA e Praia de Pau Amarelo, Paulista, PE) (Fig. 2, Tab. 1).

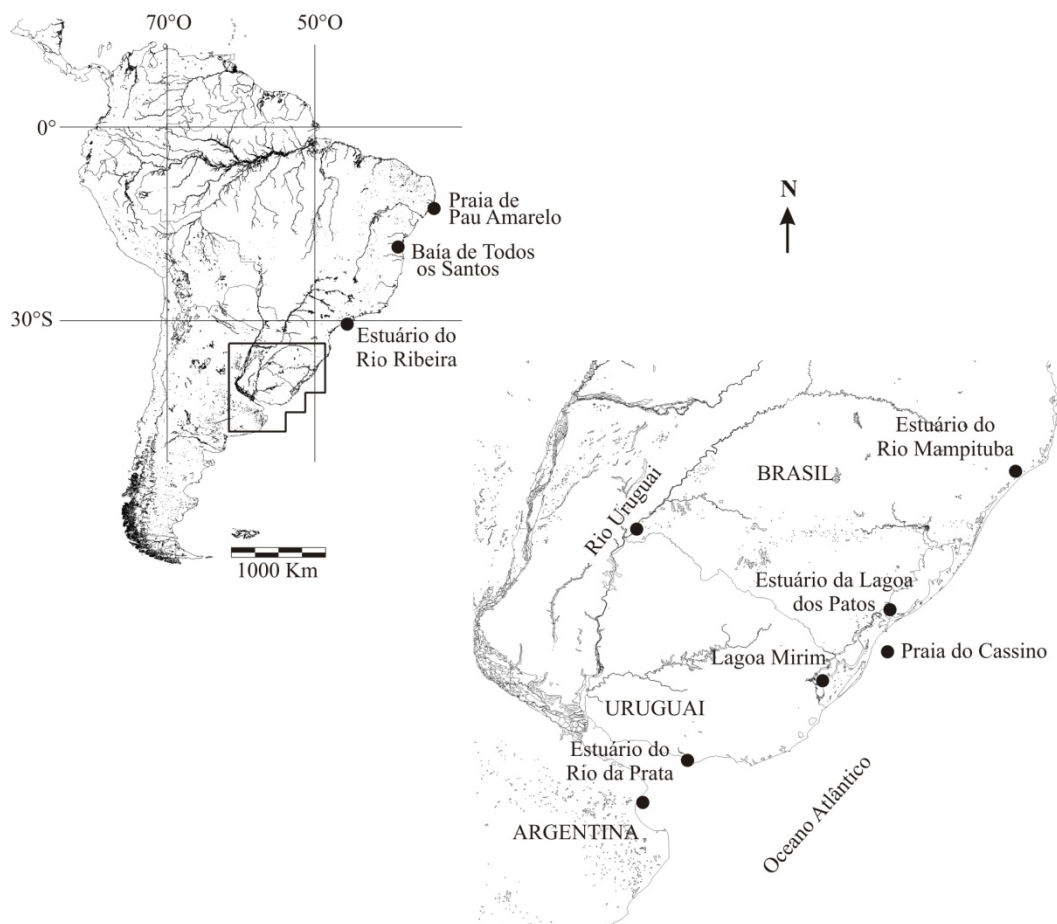


Fig. 2. Mapa dos pontos de amostragem de *Lycengraulis grossidens*.

Tabela 1. Características das áreas de amostragem de *Lycengraulis grossidens*. N número de indivíduos coletados, LAT latitude e LONG longitude.

Ambiente e localidade	Descrição	N	LAT; LONG
Salobro, estuário do Rio da Prata, Baía Samborombon, Mar Del Plata, Argentina e Maldonado, Uruguai	Segundo maior sistema estuarino na América do Sul, recebendo água dos rios Paraná e Uruguai, sua salinidade é altamente variável (0-32), possuindo estratificação vertical durante o ano (Acha et al. 2008)	99	36°21'S; 056°42'O e 34°54'S; 054°45'O
Água doce, Lagoa Mirim. Santa Vitória do Palmar, RS, Brasil	Esta lagoa possui aproximadamente 200 km de extensão e desemboca no Estuário da Lagoa dos Patos, por meio do Canal São Gonçalo. Existe a presença de uma barragem, construída em 1977 para impedir a entrada de água salgada. A temperatura de 10-31°C (Burns et al. 2006, Moura et al. 2012)	47	33°29'S; 053°29'O
Marinho, Praia do Cassino. Rio Grande, RS, Brasil	Zona de arrebentação adjacente à Lagoa dos Patos, onde a salinidade varia entre 10-37 e temperatura entre 10-24°C (Busoli & Muelbert 2003, Mont'Alverne et al. 2012, Rodrigues & Vieira 2012)	146	32°13'S; 052°10'O
Salobro, Estuário da Lagoa dos Patos. Rio Grande, RS, Brasil	Ambiente bastante variável. Podendo apresentar alterações na salinidade ao longo de poucas horas, variando de 0-32, segue um padrão sazonal (verão seco e inverno úmido). É influenciado principalmente pelas chuvas e ventos (Seeliger et al. 1997, Seeliger & Odebrecht 2010)	83	31°57'S; 052°05'O
Água doce, Rio Uruguai. Uruguiana, RS, Brasil	A barragem de Salto Grande de 30 m de altura, instalada em 1979, possui duas passagens de peixes do tipo Borland, está localizado a 550 km do litoral. A faixa de temperatura é de 16-30°C (Bortoluzzi et al. 2006; Oldani et al. 2007)	56	29°45'S; 057°06'O
Salobro, Estuário do Rio Mampituba. Passo de Torres, SC, Brasil	Pequeno estuário com área de 0,3-0,5 km ² . As flutuações de temperatura da água seguem um padrão sazonal variando de 19-25°C (Ramos 2005)	41	29°19'S; 049°43'O
Salobro, Estuário do rio Ribeira. Iguape, SP, Brasil	Esta área é separada do oceano pela Ilha Comprida. A área é sazonalmente influenciada por descargas fluviais com valores de salinidade variando 8-33 (Coimbra et al. 2007)	62	24°44'S; 047°34'O
Marinho, Baía de Todos os Santos. Salvador, BA, Brasil	Valores de salinidade e temperatura da água dentro da baía na faixa de 32-37 e 26-30°C, respectivamente. A circulação no interior da baía é primariamente forçada pelas marés e não varia significativamente ao longo do ano (Cirano & Lessa 2007)	51	12°48'S; 038°44'O
Marinho, Praia de Pau Amarelo. Paulista, PE, Brasil	Ambiente com pouca variação sazonal. A faixa de salinidade varia de 33-36, e a temperatura da água de 26-29°C (M. F. Nóbrega, pers. comm.)	36	7°54'S; 034°47'O

Amostragem do material biológico

As amostragens foram realizadas com uma variedade de petrechos de pesca, tais como rede de arrasto de praia, redes de emalhe e tarrafas, com o intuito de coletar a espécie de interesse. Na maioria dos pontos amostrais as coletas foram realizadas por pescadores profissionais ou em expedições de pesquisadores entre dezembro de 2009 a dezembro de 2012.

Foram coletados no mínimo 30 exemplares de *L. grossidens* em cada ponto. Estes peixes foram crioanestesiados e conservados em gelo até a chegada ao laboratório. Todos os exemplares foram medidos e tiveram 20 mg de tecido muscular retirados e conservados em etanol absoluto 99,5 %, para posterior extrações de DNA. Otólitos *sagitta* de cerca de 20 exemplares por local foram retirados, limpos e estocados secos em microtubos individuais.

Posteriormente, alguns exemplares foram fixados em formol 10%, preservados em álcool 70%, e tombados na Coleção de Ictiológica da FURG. As amostragens foram autorizadas pelo IBAMA (Processo: 22692).

SÍNTESE DOS RESULTADOS

A síntese dos resultados será apresentada na forma de capítulos. Sendo que nos três primeiros capítulos são apresentados a síntese dos resultados, pois estes possuem sua versão na íntegra, em inglês, na forma de anexo. E o quarto capítulo, é completo em português, estando em sua íntegra no corpo principal da tese.

CAPÍTULO 1

Revisão e considerações sobre o uso do habitat, distribuição e história de vida de *Lycengraulis grossidens*

Mai, A. C. G. & Vieira, J. P. 2013. Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae). *Biota Neotropica*, 13(3): 121-130. Versão completa acessível no **Anexo I** ou no endereço eletrônico <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n3>

Ao revisar a literatura referente à *L. grossidens* (Fig. 1.1 e 1.2), foi possível identificar um total de 93 trabalhos entre artigos, livros, teses e trabalhos apresentados em congressos, que traziam informações sobre a espécie. O período de estudo abrangeu trabalhos que datam de 1906 a 2013. A maioria dos trabalhos (43) se concentra em estudos de ecologia de comunidades de peixes, 14 tratam especificamente da espécie de interesse, 11 foram focados em capturas acessórias da pesca de camarão e 25 compreendem outras áreas do conhecimento.



Figura 1.1. *Lycengraulis grossidens*, exemplar capturado em Solis Grande, Uruguai.

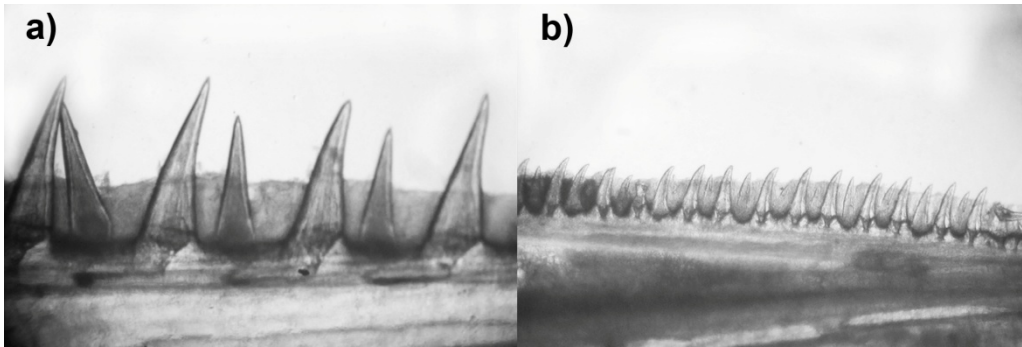


Figura 1.2. Caractere diagnóstico para a distinção entre a) *Lycengraulis grossidens* (Mandíbula inferior; 110 mm de comprimento total, dentição tipo caniniforme) e b) *Anchoviella lepidentostole*, 110 mm de comprimento total, dentição tipo filiforme). Lupa Zeiss, aumento de 2.5 vezes.

Os trabalhos que abordam a ecologia desta espécie estão concentrados na região sul do Brasil, onde a espécie é abundante em zonas estuarinas, e frequente em lagoas costeiras, principalmente no Rio Grande do Sul (Oliveira 1997, Vieira et al. 2010). Há também diversos trabalhos na região da Argentina.

Muito dos aspectos abordados neste trabalho, foram apresentados na introdução desta tese. Vale ressaltar ainda que *L. grossidens* apresenta uma estratégia alimentar generalista, se alimentando principalmente de insetos, crustáceos, moluscos, poliquetas e de peixes ósseos (Ramos 2005, Froese & Pauly 2013). Mas há uma mudança ontogenética em sua dieta, onde juvenis se alimentam de invertebrados (zooplâncton) e quando atingem cerca de 140 milímetros, passam a se alimentar, principalmente de peixes (Ramos 2005, Oliveira 2008).

Outro aspecto relevante, e que precisa ser abordado em maior detalhe, se refere ao uso do hábitat pela espécie. Isso porque, ao longo de sua distribuição, a espécie tem sido classificada de diferentes maneiras, desde

residentes de água doce, anádromos, marinhos migrantes, estuarinos residentes, catádromo e semi-catádromo (Mastrarrigo 1947, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Weiss & Krug 1977, Vasconcelo-Filho & Oliveira 1999, Krumme et al. 2004, Ramos 2005, Sánchez-Botero et al. 2008, Reis-Filho et al. 2010, Vieira 2010, Vilar et al. 2011). Todos estes estudos baseiam-se em dados de frequência e abundância relativa da espécie. Dentro deste contexto, foi possível concluir que a espécie é capaz de se reproduzir em água doce ou salgada, com uma alta plasticidade no uso do habitat e na sua história de vida, com componentes migrantes e residentes no mesmo local.

Além disso, a compilação destas informações nos deu indícios de que o comportamento migratório da espécie apresenta um padrão clinal, mostrando mais indivíduos diádromos nas maiores latitudes e mais marinhos migrantes ao longo da costa tropical do Brasil.

CAPÍTULO 2

Alta plasticidade no uso do habitat apresentado por

Lycengraulis grossidens

Mai, A. C. G., Condini, M. V., Albuquerque, C. Q., Loebmann, D., Saint'Pierre, T. D., Miekeley, N., Vieira, J. P. High plasticity in habitat use of *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulididae). Submetido a Estuarine, Coastal and Shelf Science em 01/10/2013 (**Anexo II**).

Um total de 139 otólitos de *Lycengraulis grossidens* foi analisado. Os indivíduos incluíam jovens e adultos, com comprimentos totais que variaram de 70 a 290 mm. Os resultados das razões $^{86}\text{Sr}:\text{Ca}$ e $^{138}\text{Ba}:\text{Ca}$ das bordas (representativa da deposição recente) permitiram discriminar os ambientes de água doce dos estuarinos e marinhos. Como esperado a razão de Sr:Ca foi menor em água doce (média \pm DP = 0,083 \pm 0,034 no Rio Uruguai e 0,082 \pm 0,048 na Lagoa Mirim, RS) e mais alta em zonas estuarinas e marinhas (p. ex. 0,291 \pm 0,118 na Praia de Pau Amarelo, PE). Por outro lado, a razão Ba:Ca foi significativamente mais alta na água doce (0,020 \pm 0,008 no Rio Uruguai e 0,026 \pm 0,019 na Lagoa Mirim) que em ambientes estuarinos e marinhos (p. ex. 0,002 \pm 0,001 na Praia de Pau Amarelo).

Os perfis de leituras das razões Sr:Ca e Ba:Ca ao longo da vida, ou seja, do núcleo do otólito a borda, sugerem a existência de quatro padrões de uso do

habitat, são eles residentes de água doce, estuarino/marinhos residentes, e diádromo/nômades do tipo A e do tipo B (Fig. 2.1.).

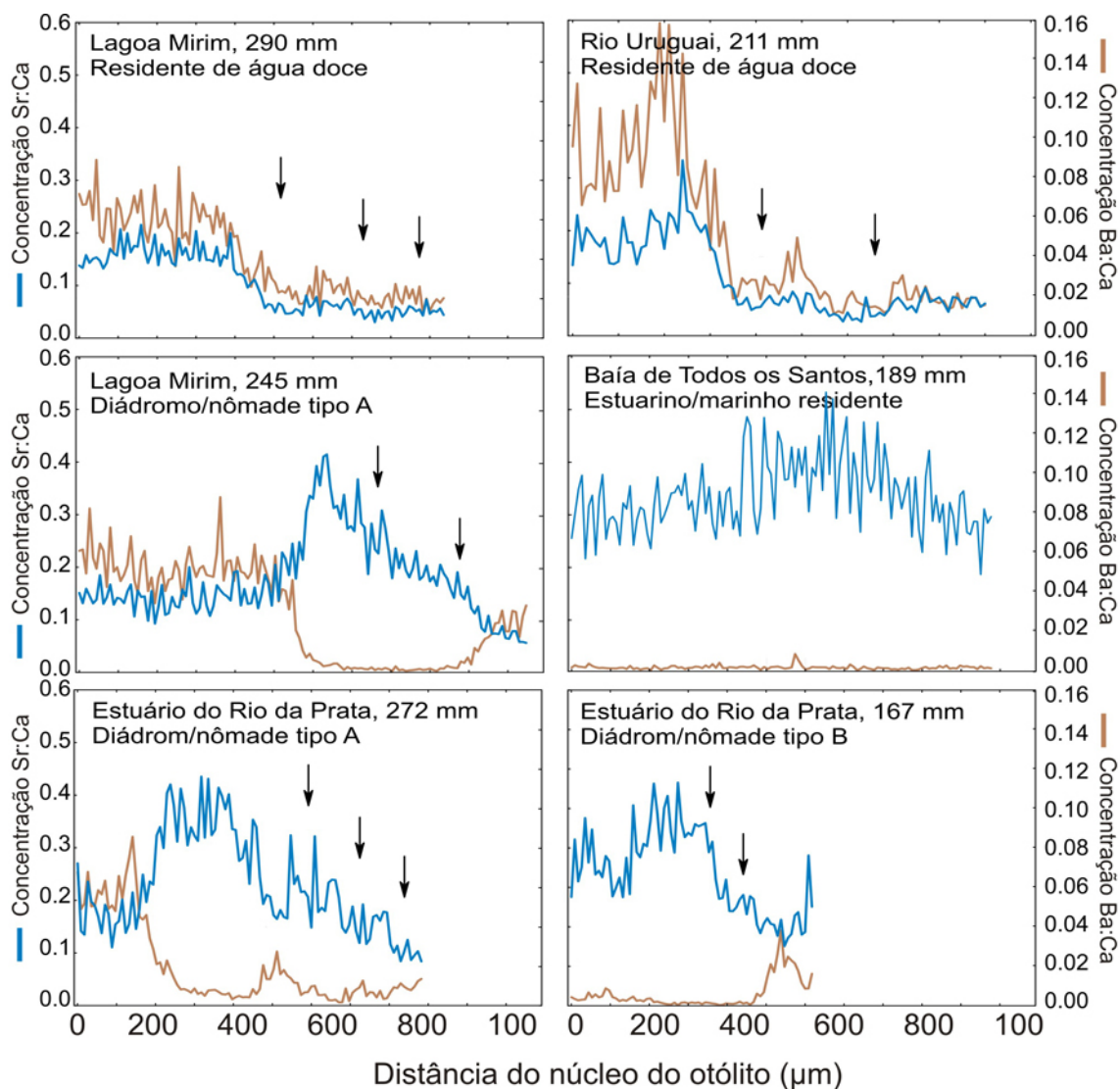


Figura 2.1. Perfis de otólitos de *Lycengraulis grossidens* mensurado por LA-ICPMS do núcleo à borda para $^{86}\text{Sr}:^{43}\text{Ca}$ (linha azul) e $^{138}\text{Ba}:^{43}\text{Ca}$ (linha marron). Para cada indivíduo, estão indicados no gráfico, o local de captura, o comprimento total e a classificação quanto ao uso do habitat. As setas representam a posição dos anelli.

A abundância relativa de cada contingente variou entre os locais, com um aparente padrão de mudança latitudinal. Indivíduos amostrados em baixas latitudes (entre 7 e 25°S) foram predominantemente estuarino/marinhos

residentes. Já em altas latitudes (entre 30 e 36°S) os indivíduos foram, em sua maioria, diádromo/nômades do tipo A e B (Fig. 2.2.).

Como esperado, quase todos os indivíduos provindos dos locais de água doce (Lagoa Mirim e Rio Uruguai) tiveram assinaturas químicas representativas de residentes de água doce, o que evidencia possíveis populações restritas a ambientes límnicos e/ou sem acesso ao mar. Exceto oito indivíduos da Lagoa Mirim, que apresentaram proporções de Sr:Ca e Ba:Ca típicos de ambientes estuarino/marino e de água doce ao longo de suas histórias de vida, característico do padrão diádromo/nômade do tipo A.

Medimos também, a razão isotópica $^{87}\text{Sr}:^{86}\text{Sr}$, que segundo a literatura responde a gradientes salinos, porém não encontramos esta correlação. Outros elementos que foram analisados, mas que também não trouxeram relação com a salinidade desses ambientes amostrados na espécie de interesse foram

^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{208}Pb , ^{66}Zn e ^{23}Na .

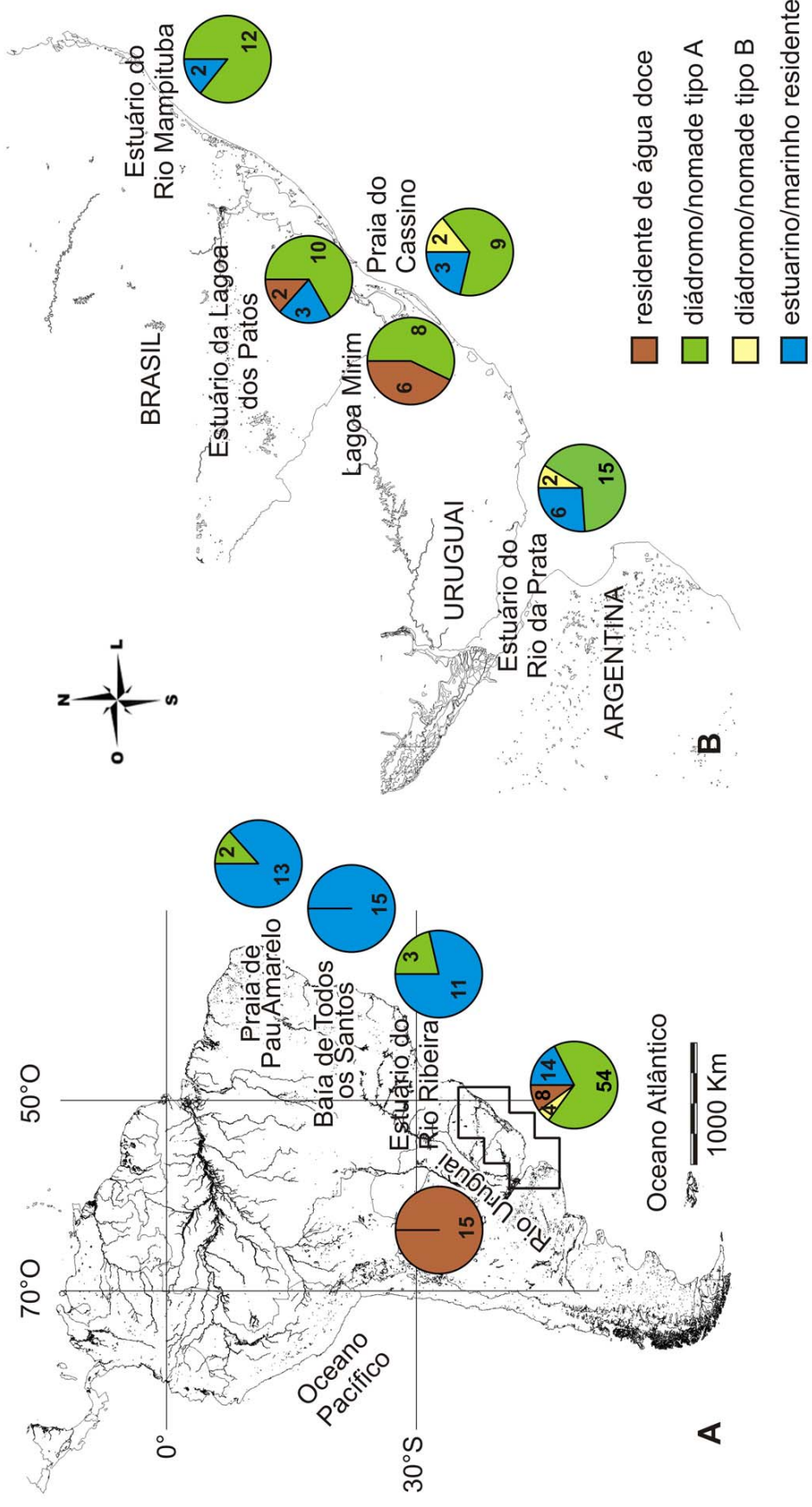


Figura 2.2. Mapa dos locais de amostragem de *Lycengraulis grossidens* (A) longo da América do Sul e (B) em detalhe no sul da área amostrada. Os nove locais amostrados encontram-se por extenso. Para cada região, o gráfico de pizza mostra a distribuição dos contingentes capturados, classificados em residentes de água doce, estuarino/marinhos residentes e diádromo/nômades do tipo A e B.

CAPÍTULO 3

Isolamento e caracterização de 18 microssatélites para *Lycengraulis grossidens*

Mai, A. C. G., J. P. Vieira, A. A. Plavan, M. F. Nobrega³, L. E. Moraes¹, F. L. Rodrigues, L. F. Marins. 2013. Isolation and characterization of 18 microsatellites for *Lycengraulis grossidens* (Pisces: Clupeiformes). *Conservation Genetics Resources*, 5: 15-18. Versão completa acessível em **Anexo III** ou pelo doi 10.1007/s12686-012-9718-2

Para realização deste trabalho foi construída uma biblioteca genômica para *L. grossidens* seguindo o protocolo rápido de isolamento e amplificação de fragmentos de sequências repetidas com polimorfismo de comprimento (Zane et al. 2002, Liao et al. 2007). Esta etapa foi realizada na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A partir da biblioteca genômica um total de 30 pares de iniciadores (primers) para regiões microssatélites (Fig. 3.1) foram desenhados e sintetizados. Cinco deles não mostraram sucesso na amplificação via reação em cadeia de polimerase (PCR), outros sete não apresentaram padrões claros de banda em gel de poliácridamida 6%, e seis se apresentaram monomórficos.

Com isto, obtivemos um total de doze loci microssatélites polimórficos e seis não-polimórficos. Sendo estas sequências depositadas no GenBank com

CAPÍTULO 4

Estruturação genética de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes) do sul do Brasil à Argentina: O papel do gradiente de salinidade.

RESUMO

Lycengraulis grossidens é encontrado em abundância em estuários, mas também é frequente em ambientes marinhos e de água doce na América do Sul. Esta distribuição pode ser explicada pelo seu comportamento migratório, porém, sabe-se que a espécie apresenta migração parcial e populações residentes de água doce. Partindo destes pressupostos, este trabalho se propôs a investigar os padrões de estruturação genética apresentados por *L. grossidens* em ambientes de água doce (Rio Uruguai e Lagoa Mirim), ambientes estuarinos (Rio da Prata, Lagoa dos Patos e Rio Mampituba) e ambiente marinho (Praia do Cassino) na porção sul da distribuição da espécie. Análises filogenéticas e filogeográficas foram realizadas com base nas sequências da região conhecida como Citocromo b oxidase e da região controle do DNA mitocondrial. Dados de estruturação genética demonstram a presença de uma população panmítica de *L. grossidens* ao longo da maior parte da área de estudo, com exceção dos indivíduos provenientes do Rio Uruguai, os quais estão isolados geneticamente com relação das demais populações ($F_{st} \geq 0,09$, $p < 0,001$). Alguns indivíduos da Lagoa Mirim revelam indícios de fluxo restrito de genes. Nossa hipótese de rota de colonização para ambientes da água doce (Rio Uruguai e Lagoa Mirim) é via os estuários do Rio

da Prata e da Lagoa dos Patos, respectivamente. Desta maneira, nossos resultados ressaltam a plasticidade da espécie em colonizar, novamente, habitats de água doce.

Palavras-chave: genética de populações, biogeografia, isolamento em água doce, fragmentação alopátrica, fluxo restrito de genes, região controle do DNA mitocondrial.

INTRODUÇÃO

Os peixes da família Engraulidae são primariamente marinhos, mas na América do Sul existem pelo menos 12 espécies que ocorrem em rios tropicais (Bloom & Lovejoy 2011). O gênero *Lycengraulis* é uma linhagem de água doce resultante da transgressão marinha ocorrida no Mioceno, que formou o mar interior Pebas (cerca de 15 milhões de anos atrás) (Monsch 1998). Outros exemplos de gêneros desta família que ocorrem em água doce, principalmente no Rio Amazonas, são os *Amazonsprattus*, *Anchoviella*, *Jurengraulis* e *Pterengraulis* (Bloom & Lovejoy 2012). Acredita-se que sejam resultado deste mesmo evento transgressional, as raias-de-água-doce (*Potamotrygon*), o peixe-agulha (*Potamorrhaphis*), as pescadinhas (*Plagioscion*) entre outros (Bloom & Lovejoy 2011, Cooke et al. 2012).

Atualmente se reconhece que *Lycengraulis grossidens* e *L. poeyi* são espécies derivadas, que retornaram ao mar, a partir de uma população ancestral de *L. batesii*, que ainda habita o Rio Amazonas (Bloom & Lovejoy 2012). A espécie *L. grossidens*, foco deste trabalho, ocorre atualmente em estuários, em alguns rios e na região costeira do oeste do Atlântico Sul, de Belize a Argentina (Whitehead et al. 1988). Trata-se de uma espécie pelágica

de médio porte, atingindo 300 mm, iteropara, maturando por volta de 120 mm, com mais ou menos um ano de vida, e vivendo por cerca de três anos (Castello & Krug 1978, Mai & Vieira 2013).

No nordeste do Brasil a espécie possui um comportamento mais costeiro, utilizando os estuários de maneira oportunista, já no sudeste a espécie parece usar os estuários como uma rota para realizar migração e ou como habitat por toda a vida (Mai & Vieira 2013). Uma adaptação extrema de *L. grossidens* em ambientes límnicos ocorre na bacia do Paraná, onde a espécie é registrada o ano todo no Rio Uruguai, a mais de 550 km do mar, a montante da barragem de Salto Grande e também no Rio Paraná, a 1500 km do mar (Teixeira de Melo et al. 2011, Benedito-Cecilio et al. 1997).

Em meados do século XX, Fuster de Plaza & Boschi (1961) acreditavam na existência da espécie *Lycengraulis olidus*, ocorrendo na bacia do Paraná e litoral argentino, uruguaio e sul brasileiro. Baseados em caracteres morfológicos, estes autores, mostraram que tanto indivíduos provenientes de água doce quanto os marinhos se tratavam da mesma espécie. Atualmente *L. olidus* é considerada sinonímia de *L. grossidens* (Whitehead et al. 1988) e se distribui ao longo de todo o gradiente. A revisão do ciclo de vida de *L. grossidens* efetuada por Mai e Vieira (2013) gerou diversas perguntas sobre a conectividade desses indivíduos de água doce e os costeiros.

Análises químicas de otólitos realizadas por Mai et al. (submetido) confirmam a plasticidade no uso de habitats pela espécie. Este trabalho mostrou que os indivíduos de *L. grossidens* coletados no Rio Uruguai (Uruguaiana, RS) são residentes de água doce, e que na Lagoa Mirim (Santa Vitória do Palmar, RS) há dois contingentes, um residente de água doce, e

outro que realiza diadromia. O isolamento de parte da população em água doce pode acarretar um isolamento reprodutivo, o que pode levar a especiação (McDowall 2008). Eventos de rápida especiação já foram registrados para esta região geográfica para *Odontesthes perugiae* (Atherinidae), que na verdade, representa um complexo de espécies distribuídas ao longo das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul (Beheregaray et al. 2002).

Este trabalho é o primeiro a utilizar ferramentas moleculares para compreender a estruturação genética de *Lycengraulis grossidens* ao longo de um gradiente de salinidade. As transições entre os biomas marinhos e de água doce são eventos raros (Alverson et al. 2007, Logares et al. 2010). Essas transições ocorrem com pouca frequência ao longo do tempo geológico, indicando a presença de barreiras abióticas e bióticas. A barreira mais óbvia é o contraste drástico na concentração de salinidade e a consequente demanda fisiológica aos organismos aquáticos para manterem o equilíbrio osmótico com o meio circundante (Lee & Bell 1999, Vermeij & Dudley 2000, Vermeij & Wesselingh 2002, Bloom & Lovejoy 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de fluxo gênico entre as populações de *L. grossidens* de água doce e costeiras da região Sul da América do Sul, fornecendo subsídios para o esclarecimento do cenário espaço-temporal envolvido na colonização destes habitats. As hipóteses deste trabalho são: i) o isolamento de populações em ambientes límnicos, e ii) a rota de colonização desses ambientes é via conexões entre o ambiente marinho e o de água doce.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Entre os anos de 2010 e 2011, 197 indivíduos de *L. grossidens* foram coletados em um trecho do litoral e de águas interiores da América do Sul. Nossas amostras incluíram indivíduos provindos do Rio Uruguai e da Lagoa Mirim (ambientes límnicos), dos estuários da Lagoa dos Patos, RS, do Rio da Prata, divisa Argentina/Uruguai e do Rio Mampituba, SC (ambientes estuarinos) e da Praia do Cassino, RS (ambiente marinho) (Tab. 4.1).

Amplificação e sequenciamento de regiões do mtDNA

Foram utilizadas, primariamente, sequências do DNA mitocondrial compreendendo 341 pb do gene Citocromo b oxidase (L14735: AAAAA CCACC GTTGT TATTC AACTA e H15149: GCCCC TCAGA ATGAT ATTTG TCCTCA) (Wolf et al. 1999) para confirmação da identidade genética e também para avaliação das relações de parentesco com outras espécies deste gênero. Para tal análise, utilizamos sequências do GenBank provenientes de três indivíduos de *L. batesii* (números de acesso JQ012410.1, JQ012326.1 e JQ012411.1), um de *L. poeyi* (JQ012370.1) e quatro de *L. grossidens* do estuário do Rio da Prata (AP011563, NC014279, JQ012397 e JQ012396). Além disso, amplificamos e sequenciamos 12 indivíduos de *L. grossidens* (quatro indivíduos residentes do Rio Uruguai, quatro indivíduos residentes da Lagoa Mirim e quatro indivíduos diádromos do Estuário da Lagoa dos Patos).

Para o estudo de estruturação genética e filogeografia, a região controle do mtDNA foi amplificada para todos os 197 indivíduos amostrados (Tab. 4.1) utilizando os seguintes iniciadores degenerados: MitDL-F (5'-ACCCY TRRCT CCCAA AGCYA-3') e MitDL-R (5'-GGTGC GGRKA CTTGC ATGTR TAA-3') (Huang et al., 2009, Li et al., 2012). Em cada caso, a reação em cadeia da

polimerase (PCR) foi realizada em um volume total de 30 µl contendo: 10–50 ng DNA, 1×buffer, 0.2 mM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl², 0,2 mM dNTP e 0.5U de Taq Platinum® (Invitrogen, Brasil). Os fragmentos foram amplificados em MJ Research PTC-100 Thermal Cycler com 95°C de temperatura inicial de desnaturação por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente os fragmentos foram purificados e sequenciados na Macrogen Inc., Korea com o uso dos mesmos iniciadores utilizados nas ampliações.

Análise de dados

As sequencias de DNA foram alinhadas e conferidas mediante visualização dos cromatogramas usando o Bioedit (Hall 1999). Regiões do alinhamento que não puderam ser alinhadas com confiabilidade foram eliminadas. O programa DNASP 5.0 (Librado & Rozas 2009) foi usado para gerar os arquivos *.arp e *.phy, que foram posteriormente utilizados nos programas Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005) e TCS, respectivamente.

Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e FS de Fu (Fu 1997), avaliados com significância de 1.000 permutações randômicas e os dois testes análogos de diferenciação genética (Fst), a estatística F convencional apenas com frequências haplotípicas e as frequências e diferenças pareadas (Slatkin 1995), avaliados com significância de 10.000 permutações randômicas, foram executados no Arlequin.

A estrutura populacional foi investigada com a análise molecular de variância (AMOVA) no Arlequin. Para testar nossa hipótese de isolamento genético da população de água doce, a AMOVA foi realizada subdividindo-se

as amostras nas duas maiores partições filogeográficas identificadas com o uso do F_{st} , ou seja, sob o agrupamento dos indivíduos do Uruguai versus não-Uruguai. Outro método para investigar a estrutura espacial das populações de *L. grossidens* foi a análise espacial de variância molecular (SAMOVA) (Dupanloup et al. 2002). A SAMOVA define grupos de populações que são geograficamente homogêneos e maximamente diferenciados uns dos outros. Estes métodos indicam o grau de estruturação genética entre as populações, mas não fornece nenhuma informação sobre relações genealógicas. Por conseguinte, uma rede de haplótipos foi calculada utilizando o método de parcimônia estatística aplicada no programa TCS v.1.21 (Clement et al. 2000).

O teste de Mantel (Mantel 1967) foi realizado para verificar as relações entre genética (F_{st}) e distância geográfica calculado em quilômetros usando Diva v. 7.5 (<http://www.diva-gis.org/>). A significância da correlação de Mantel foi estimada utilizando 5000 permutações (Smouse et al. 1986).

Por fim, utilizou-se o método probabilístico baseado em coalescência e implementado no programa LAMARC (Likelihood Analysis with Metropolis Algorithm using Random Coalescence) (Kuhner 2006) para o cálculo de número efetivo de fêmeas (N_{ef}) e número efetivo de fêmeas migrantes (N_{efm}). Para tanto, foram realizadas quatro corridas simultâneas, cada qual com 100 cadeias iniciais e dez cadeias finais, com um mínimo de 500 e 10.000 amostragens, respectivamente, realizadas sempre a cada 20 gerações após um *burnin* de 1.000 gerações. Para todas as análises, duas populações foram designadas (Uruguai versus não-Uruguai), com permissão de crescimento para ambas e migração bi-direcional.

Árvore filogenética

Uma inferência bayesiana baseada em coalescência foi utilizada na estimativa dos tempos de divergência, com o uso do programa Beast 1.6.1 (Drummond & Rambaut 2007). Para tanto, Modeltest 3,06 (Posada & Crandall 1998) foi usado, em conjunto com o PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), para estimar o modelo ideal de evolução para a matriz de dados da região controle, usando o teste hierárquico da razão de verossimilhança e o critério de informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). O modelo selecionado foi o *general time reversible* (GTR) com uma proporção de sítios invariáveis (I) e uma correção gama para evolução dos demais (G). Como *prior* de taxa mutacional utilizamos a média de $1,25 \times 10^{-7}$ com distribuição uniforme entre 5×10^{-8} e 20×10^{-7} , conforme sugerido por Liu et al. (2006) para populações de *Engraulis japonicus* e *E. australis*. Além disso, esta análise foi realizada sobre a distribuição log-normal de relógio molecular relaxado (uncorrelated relaxed clock lognormal distribution - UCLD) e pré-suposição de tamanho populacional constante. O número de gerações na MCMC (Markov Chain Monte Carlo) foi de 500 milhões, com os resultados amostrados a cada 10 mil interações e descarte das árvores geradas antes da estabilização (aproximadamente 10%). As amostragens obtidas no programa BEAST foram avaliadas no Tracer 1.4 (Drummond et al, 2005), onde foram estimados os valores de ESS (Effective Sample Size) de cada parâmetro e a convergência ao longo da corrida. Posteriormente, o TreeAnnotator 3.7.5 foi utilizado na construção da árvore de máxima credibilidade dos clados, onde os resultados gerados antes da estabilização visualizada no Tracer (aproximadamente 10%) foram descartados.

Análise de clados aninhados

A história biogeográfica de *L. grossidens* foi avaliada ainda através da realização da análise filogenética de clado aninhado (NCA or NCPA – nested clade phylogenetic analysis). Os agrupamentos hierárquicos formados fornecem informações para testar se existe alguma associação significativa entre os níveis dos cladogramas dos haplótipos e sua localização geográfica através de uma análise de contingência (Templeton 2006). NCPA tem o poder de distinguir padrões filogeográficos causados por processos como fluxo gênico contemporâneo restrito, fragmentação e expansão, e fornece um meio de explorar cenários complexos da história evolutiva (Templeton 1998).

Assim, a rede de haplótipos gerada no TCS teve seu formato aninhado construído usando as regras pré-estabelecidas por Templeton (2006). Esses dados, juntamente com as informações geográficas das coletas, foram então estatisticamente avaliados quanto à presença de uma associação significativa entre geografia e variabilidade genética no GeoDis 2.6 (Posada et al. 2000) com 5.000 permutações. Os resultados significativos foram interpretados com o uso da mais recente chave de inferência (6 de janeiro de 2011) disponível em <http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>.

RESULTADOS

A rede de haplótipos construída com 341 pb da região Citocromo b oxidase, confirmou a identidade dos indivíduos provindos do Rio Uruguai, Lagoa Mirim e porção estuarina/marinha do Brasil e Argentina como sendo *L. grossidens* (Fig. 4.1). Um total de 197 indivíduos, dos seis pontos amostrais, incluindo indivíduos de água doce, estuarinos e marinhos tiveram a região

controle do DNA mitocondrial sequenciados (Fig. 4.1). Obtivemos 910 pares bases (pb) deste fragmento, das 1021 pb reportadas para esta região controle do mtDNA em *L. grossidens* (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A diversidade de haplótipos foi bastante elevada, gerando 93 diferentes haplótipos. A população do Rio Uruguai foi a que apresentou menor diversidade haplotípica ($H_d = 0,936 \pm 0,024$), ainda assim com valores bastantes elevados (Tab. 4.1). Apenas o haplótipo 6 foi compartilhado pelas seis populações, e, como este constituiu-se também no haplótipo mais freqüente (16), foi inferido como ancestral. Tanto o teste neutralidade D de Tajima como F_s de F_u mostraram valores negativos significativos em muitas populações, um indicativo de expansão populacional recente (Tab. 4.1).

Os dois índices de distância genética (F_{st}) sugerem que a população do Rio Uruguai encontra-se semi-isolada geneticamente das demais, para todas as comparações par a par (Tab. 4.2). Tal resultado foi corroborado pela SAMOVA que determinou a presença de apenas duas populações na área amostrada. Os resultados da AMOVA indicam que as diferenças genéticas entre estes dois grupos principais constitui 11,38% da variação encontrada, enquanto 88,58% da variação é encontrada dentro das populações (Tab. 4.3).

O número efetivo de fêmeas migrantes da população panmítica para a população do Rio Uruguai foi bem maior (1,927) que no sentido inverso (0,382). O número efetivo de fêmeas para o Rio Uruguai foi estimado em 12.296 enquanto que na população panmítica foi estimado em 160.924 (Tab. 4.4).

A árvore filogenética sugere que a colonização do Rio Uruguai por *L. grossidens* vem ocorrendo aos pulsos. Assim, os dados obtidos sugerem a ocorrência de pelo menos quatro pulsos de entradas, uma há menos de 137 mil

anos atrás (ka), outro em 74 (ka), um terceiro entre 26-29 Ka, e um mais recente de 1-3 Ka (Fig. 4.3).

Na análise dos clados aninhados (NCA) 55 clados foram formados, em 5 níveis, e destes, 9 clados foram significativamente associados com suas localizações geográficas. Apesar da significância, em alguns clados a interpretação não foi conclusiva (Clados 1-32 e 4-2). Porém em outros os resultados conclusivos sugerem a ocorrência de expansão demográfica, a partir de um padrão de tipo estrela (Clado 2-13), fragmentação alopátrica (com presença de haplótipos únicos no Rio Uruguai) (Clados 2-3, 2-12, 2-14 e 3-3), e fluxo gênico restrito (Clados 2-5 e 3-6) (Fig. 4.4, Tab. 4.5).

DISCUSSÃO

Entender o padrão de distribuição atual das espécies pode ajudar a entender os processos históricos que causaram sua dispersão. *Lycengraulis grossidens* tem sua distribuição ao longo do litoral leste das Américas Central e do Sul (Mai & Vieira 2013). *Lycengraulis grossidens* divergiu de *L. batesi* há aproximadamente 7 milhões de anos atrás (Ma) (Bloom & Lovejoy 2012), e os dados apresentados indicam que a primeira entrada de *L. grossidens* no Rio Uruguai data de 137 mil anos atrás (ka). Esta grande diferença de tempo entre a divergência de *L. grossidens* da espécie basal (*L. batesi*) e a chegada na bacia do Paraná provavelmente corresponde ao período de sua dispersão pela costa leste da América do Sul desde o Amazonas, até o estuário do Rio da Prata.

Pelas estimativas do tempo de colonização (137 ka), os eventos paleoclimáticos envolvidos na colonização de *L. grossidens* da bacia do

Paraná, englobam o Pleistoceno tardio e o Holoceno (Quaternário). Neste período, o nível do mar apresentou, pelo menos, quatro eventos regressivos e transgressivos, um a 400 ka, o segundo a 325 ka, o terceiro a 120 ka e o mais recente aos 5 ka (Codignotto & Aguirre 1993, Tomazelli & Villwock 2005). As datas das entradas de *L. grossidens* no Rio Uruguai, aqui estimadas, sugerem um padrão de entrada em quatro pulsos distintos, podendo dois deles, serem relacionados aos dois últimos eventos transgressivos, com estimativas entre 105-137 ka e 1-3 ka, respectivamente.

A formação do sistema Patos-Mirim está datada em 400 ka, todavia, seu isolamento do ambiente marinho com a formação da Barreira III, ocorreu a cerca de 120 ka (Tomazelli & Villwock 2005). *Lycengraulis grossidens* encontra-se amplamente distribuído nesse sistema, incluindo áreas estuarinas (Vieira et al. 2010) e de água doce (Lucena et al. 1994, Milani & Fontoura 2007, Burns et al. 2006, Ceni & Vieira 2013). Nossa amostragem de material genético em área límínica nesse sistema se limitou a Lagoa Mirim. E apesar de não termos feito distinção dos dois tipos de comportamentos de uso do habitat na Mirim, residentes *versus* diádromos, nossa análise de clados aninhados sugerem que há um fluxo restrito de genes. Esta análise é exploratória, mas pode estar dando indícios que estes distintos comportamentos estariam levando a uma diferenciação populacional simpátrica na Mirim. Avaliações recentes da análise de clados aninhados (NCA) indicaram taxas excessivamente altas de erros do Tipo I, falsos positivos (Petit 2008). No entanto, Garrick et al. (2008) sugerem que a NCA é um instrumento adequado para a formulação de hipóteses sobre a história evolutiva, e essas hipóteses podem ser testadas por meio de análises complementares.

Em nosso caso de estudo, a fragmentação alopátrica registrada com haplótipos exclusivos do Rio Uruguai foi confirmada pela estatística tradicional (estatística F) e análise espacial da variância molecular. Porém, para o fluxo restrito de genes identificados na Lagoa Mirim, as análises complementares não identificaram estruturação genética. Portanto, para melhorar a resolução dessa questão, seria necessária uma análise diferenciando indivíduos residentes e migrantes em pacotes amostrais distintos.

Baseado nas evidências anteriormente mencionadas para a espécie, como sua distribuição costeira e as estimativas de colonização do Rio Uruguai há apenas 137 ka, aliados aos fatos de menor diversidade haplotípica, e de haplótipos posicionados em regiões periféricas na rede de haplótipos apresentados pelos indivíduos do Rio Uruguai nossos resultados suportam a hipótese de dispersão costeira ao longo da costa brasileira e invasão de *L. grossidens* ao Rio Uruguai via conexões entre o ambiente marinho e os de água doce. Esta hipótese se opõe a hipótese mais tradicional que explica a chegada das pescadas (Sciaenidae) de água doce desde o Amazonas até a bacia do Paraná, por via continental (Cooke et al. 2012). A hipótese de invasão continental se embasa em dois fatores principais: por as pescadas de água doce serem gêneros restritos aos ambientes de água doce, e pelas datas estimadas de entre 15 e 7 Ma de divergência e provável colonização de *Plagioscion ternetzi* na bacia do Paraná (Cooke et al. 2012). Esta rota continental, também é a hipótese mais provável para as raias de água doce *Potamotrygon* que tem sua distribuição tanto na bacia amazônica quanto na bacia do Paraná (Carvalho et al. 2003, Oddone et al. 2012).

Pouco se conhece da história filogeográfica das outras linhagens de Engraulididae de água doce. Sabe-se que alguns gêneros são limitados a bacia do Amazonas, como o caso de *Jurengraulis* e *Amazonsprattus* (Lavoue et al 2010). *Pterengraulis atherinoides* apesar de ter retornado ao mar, se manteve com uma distribuição limitada, ocorrendo do Delta do Orinoco, Venezuela ao Ceará, Brasil, sempre próximos a rios (Froese & Pauly 2011). Muitas espécies de *Anchoviella* se mantiveram restritas a bacia do Amazonas (e.g. *Anchoviella alleni*, *A. carrikeri* e *A. nattereri*), mas algumas possuem ocorrência em outras bacias, como a *A. vaillanti*, endêmica da bacia do Rio São Francisco, Brasil (Silva et al. 2010) e *A. perezi* endêmica do delta do Rio Orinoco, Venezuela (Kullander & Ferraris 2003). As espécies *A. brevirostris* e *A. lepidentostole* possuem ampla distribuição costeira, do delta do Orinoco, Venezuela, ao sul do Brasil (Whitehead et al. 1988, Froese & Pauly 2013), e comportamentos de uso de habitats estuarinos e de água doce são ainda pouco compreendidos. Estudos mais aprofundados, principalmente, nas duas últimas espécies supracitadas, poderiam corroborar as hipóteses levantadas por este trabalho, já que possuem muitas similaridades com a espécie de estudo.

Dos seis pontos amostrados, cinco deles, do estuário do Rio Mampituba ao estuário do Rio da Prata, a espécie demonstrou ter alto fluxo gênico, caracterizando uma população panmítica. De acordo com Silva (2006), a partir de dados morfológicos e métricos, os indivíduos de *L. grossidens* dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul podem ser considerados uma única unidade populacional, mas distintas das demais regiões do Brasil. Todavia, este autor não avaliou indivíduos oriundos de água doce nem dos países vizinhos. Além disso, os testes de neutralidade dão indicativo de expansão

populacional recente, sugerindo que apesar da espécie ser frequentemente capturada na pesca do camarão (Branco & Verani 2006, Vianna & D’Incao 2006), ela não vem sofrendo um efeito de gargalo genético nesta região amostrada.

Conclui-se que a população de *L. grossidens* entre o sul do Brasil ao estuário do Rio da Prata trata-se de uma população panmítica, sendo que uma população de *L. grossidens* encontra-se estabelecida, semi-isolada, no Rio Uruguai. Esse semi-isolamento não foi causado pela ação antrópica (construção de barragens), já que a região controle do mtDNA possui uma taxa mutacional na casa dos milhares de anos. Assim, nossa hipótese é de que a entrada de *L. grossidens* ocorreu via ambiente costeiro em pelo menos quatro pulsos distintos, provavelmente correlacionados a eventos transgressivos/regressivos do nível do mar no quaternário.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.*, 19: 716-723.
- ALVERSON, AJ, JANSEN, RK & EC THERIOT. 2007. Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Mol. Phylog. Evol.*, 45: 193-210.
- BEHEREGARAY, LB, SUNNUCKS, P & DA BRISCOE. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc. Royal Soc; London B*, 269: 65-73.

- BENEDITO-CECILIO, E, AGOSTINHO, AA, JÚLIO-JR, HF & CS PAVANELLI. 1997. Colonização ictiofaunística do reservatório de Itaipu e áreas adjacentes. *Rev. Brasil. Zool.*, 14(1): 1-14.
- BLOOM, DD & NR LOVEJOY. 2011. The Biogeography of Marine Incursions in South America. In: JS ALBERT & RE REIS. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. University of California Press, Berkeley, Chap. 8: 137-144.
- BLOOM, DD & NR LOVEJOY. 2012. Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). *J. Evol. Biol.*, 25: 701-715.
- BRANCO, JO & JR VERANI. 2006. Análise quali-quantitativa da ictiofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas, na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina. *Rev. Bras. Zool.*, 23(2): 381-391.
- BURNS, MDM, GARCIA, AM, VIEIRA, JP, BEMVENUTI, MA, MARQUES, DMLM & V CONDINI. 2006. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.*, 4(1): 69-72.
- CASTELLO, JP & LC KRUG. 1978. Distribution, growth and spawning groups of the manjuba (*Lycengraulis grossidens*) in the estuary of the Lagoa dos Patos - Rio Grande do Sul - Brazil. *Atlântica*, 3: 33-46.
- CARVALHO, MR, LOVEJOY, NR & RS ROSA. 2003. Family Potamotrygonidae (River stingrays). In: RE Reis, SO Kullander & CJ Ferraris (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, p. 22-28.

- CENI, G & JP VIEIRA. 2013. The influence of net size and shape on the characterization of littoral fish fauna of a subtropical lake in southern Brazil. *Zool., no prelo.*
- CLEMENT, M, POSADA, D & KA CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9: 1657-1659.
- CODIGNOTTO, JO & ML AGUIRRE. 1993. Coastal evolution, changes in sea level and molluscan fauna in northeastern Argentina during the Late Quaternary. *Mar. Geol.*, 110(1-2): 163-175.
- COOKE, GM, CHAO, NL & LB BEHEREGARAY. 2012. Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). *J. Biogeog.*, 39: 724-738.
- DRUMMOND, AJ, RAMBAUT, A, SHAPIRO, B & OG PYBUS. 2005 Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 22(5): 1185-1192.
- DRUMMOND, AJ & A RAMBAUT. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, 7: 214.
- DUPANLOUP, I, SCHNEIDER, S & L EXCOFFIER. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.*, 11(12): 2571-2581.
- EXCOFFIER, L, LAVAL, G & S SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf.*, 1: 47-50
- FROESE, R & D PAULY. 2013. FishBase. World Wide Web electronic publication. ww.w.fishbase.org, acessado em 08/10/2013)

- FU, YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- FUSTER DE PLAZA, ML & EE BOSCHI. 1961. Areas de migracion y ecologia de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en las aguas argentinas (Pisces, fam. Engraulidae). *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*, 1(3): 127-183.
- GARRICK, RC, DYER, RJ, BEHEREGARAY, LB & P SUNNUCKS. 2008. Babies and bathwater: a comment on the premature obituary for nested clade phylogeographical analysis. *Mol. Ecol.*, 17:1401-1403.
- HALL, TA. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- HUANG, Z, XU, X, TANG, J, ZHANG, J, ZHENG, J, LI, G & J HE. 2009. Application and primer design of mitochondrial DNA D-loop of freshwater fishes. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*: 1-4.
- KUHNER, MK. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinf.*, 22 (6): 768-770.
- KULLANDER, SO & CJ FERRARIS. 2003. Family Engraulididae (Anchovies). In: RE Reis, SO Kullander & CJ Ferraris-Jr (Eds.). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, 39-42.
- LAVOUE, S, MIYA, M & M NISHIDA. 2010. Mitochondrial phylogenomics of anchovies (family Engraulidae) and recurrent origins of pronounced miniaturization in the order Clupeiformes. *Mol. Phylog. Evol.*, 56: 480-485.

- LEE, CE & MA BELL. 1999. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends Ecol. Evol.*, 14:284-288.
- LI, HY, XU, TJ, CHENG, YZ, SUN, DQ & RX WANG. 2012. Genetic diversity of *Setipinna taty* (Engraulidae) populations from the China Sea based on mitochondrial DNA control region sequences. *Genet. Mol. Resear.*, 11(2): 1230-1237.
- LIBRADO, P & J ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinf.*, 25: 1451-1452.
- LIU, J-X, GAO, T-X, ZHUANG, Z-M, JIN, X-S, YOKOGAW, K & Y-P ZHANG. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Mol. Phylog. Evol.*, 40(3): 712-723.
- LOGARES, R, BRATE, J, HEINRICH, F, SHALCHIAN-TABRIZI, K & S BERTILSSON. 2010. Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11). *Mol. Biol. Evol.*, 27:347-357.
- LUCENA, CAS, JARDIM, AS & ES VIDAL. 1994. Ocorrência, distribuição e abundância de peixes na praia de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol.*, 7: 3-27.
- MAI, ACG & JP VIEIRA. 2013. Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae). *Biota Neotrop.*, 13(3): 1-10.

- MAI, ACG, CONDINI, MV, ALBUQUERQUE, CQ, LOEBMANN, D, SAINT'PIERRE, TD, MIEKELEY, N & JP VIEIRA. *in prep.* High plasticity in habitat use of *Lycengraulis grossidens* (Clupeiforme, Engraulididae).
- MCDOWALL, RM. 2008. Diadromy, history and ecology: a question of scale. *Hydrobiol.*, 602: 5-14.
- MILANI, PCC & NF FONTOURA. 2007. Diagnóstico da pesca artesanal na lagoa do casamento, sistema nordeste da laguna dos patos: uma proposta de manejo. *Biociências*, 15(1): 82-125.
- MONSCH, KA. 1998. Miocene fish faunas from the northwestern Amazonia basin (Colombia, Peru, Brazil) with evidence of marine incursions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 143: 31-50.
- ODDONE, MC, VELASCO, G & P CHARVET. 2012. Record of the freshwater stingrays *Potamotrygon brachyura* and *P. motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) in the lower Uruguay River, South America. *Acta Amazon.*, 42(2): 299-304.
- PETIT, RJ. 2008. The coup de grace for the nested clade phylogeographic analysis? *Mol. Ecol.*, 17:516-518.
- POSADA, D & KA CRANDALL. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinf.*, 14(9): 817-818.
- POSADA, D, CRANDALL, KA & AR TEMPLETON. 2000. GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Mol. Ecol.*, 9: 487-488
- SILVA, MA. 2006. Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) ao longo da costa brasileira. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Niterói, 107 p.

- SILVA; ACG, SEVERI, W & MF CASTRO. 2010. Morphological development of *Anchoviella vaillanti* (Steindachner, 1908) (Clupeiformes: Engraulidae) larvae and early juveniles. *Neotrop. Ichthyol.*, 8(4): 805-812.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- SMOUSE, PE, LONG, JC & RR SOKAL. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. *Syst. Zool.*, 35: 627-632.
- SWOFFORD, DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, Sinauer, Sunderland, MA.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- TEIXEIRA DE MELO, F, González-Bergonzoni, I & M Loureiro. 2011. Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP, Montevideo, 188 p.
- TEMPLETON, AR. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.*, 7: 381-397.
- TEMPLETON, AR. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley & Sons, New Jersey, 705 p.
- TOMAZELLI, LJ & JA VILLWOCK. 2005. Mapeamento geologic de planícies costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. *Gravel*, 3: 109-115.
- VERMEIJ, GJ & R DUDLEY. 2000. Why are there so few evolutionary transitions between aquatic and terrestrial ecosystems? *Biol. J. Linn. Soc.*, 70: 541-554.

- VERMEIJ, GJ & FP WESSELINGH. 2002. Neogastropod molluscs from the Miocene of western Amazonia, with comments on marine to freshwater transitions in molluscs. *J. Paleont.*, 76: 265-270.
- VIANNA, M & F D'INCAO. 2006. Evaluation of by-catch reduction devices for use in the artisanal pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) fishery in Patos Lagoon, Brazil. *Fish. Res.*, 81: 331-336.
- VIEIRA, JP, GARCIA, AM & L MORAES. 2010. A assembléia de peixes. In: SEELIGER, U & C ODEBRECHT (Eds.). O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. FURG, Rio Grande, 77-88.
- WHITEHEAD, PJP, NELSON, GJ & T WONGRATANA. 1988. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. FAO Fish Synopsis, Rome, 579 p.
- WOLF, C, RENTSCH, J & P HÜBNER. 1999. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1350-1355.

Tabela 4.1. Estatística exploratória para região controle (910 pb) de *Lycengraulis grossidens*. Onde: N= Número de seqüências, h = número de haplótipos, S= número de loci polimórficos, Hd = diversidade haplotípica, Pi = diversidade nucleotídica.

Localidades							Teste de Neutralidade		
	N	h	S	Hd	Pi	Tajima's D	Fu's FS	Fu's FS	
Rio Uruguai	30	15	23	0,936+/-0,024	0,006+/-0,003	-0,16		-2,80	
Estuário do Rio da Prata	41	27	36	0,969+/-0,013	0,004+/-0,002	-1,80*		-20,40*	
Praia do Cassino	24	21	27	0,989+/-0,015	0,004+/-0,002	-1,60*		-18,29*	
Lagoa Mirim	45	26	31	0,956+/-0,015	0,004+/-0,002	-1,62*		-18,24*	
Estuário da Lagoa dos Patos	30	23	31	0,979+/-0,014	0,005+/-0,003	-1,19		-14,69*	
Estuário do Rio Mampituba	27	22	25	0,977+/-0,019	0,004+/-0,002	-1,51*		-19,03*	
Total	197	93	64	0,976+/-0,004	0,004+/-0,002	-1,31*		-15,58*	

Tabela 4.2. Cálculo de distância genética para região controle (910 pb) do mtDNA de *Lycengraulis grossidens*. Na diagonal inferior estão as estatísticas baseadas nas apenas nas frequências haplotípicas. E na diagonal superior a estatística das frequências haplotípica e diferenças pareadas (Slatkin 1995).

Localidades	1	2	3	4	5	6
1 Rio Uruguai	0	0,0417*	0,0339*	0,0506*	0,0361*	0,0413*
2 Estuário do Rio da Prata	0,1021*	0	-0,0068	-0,0004	0,0063	-0,0079
3 Praia do Cassino	0,0976*	-0,0143	0	-0,0090	-0,0023	-0,0064
4 Lagoa Mirim	0,1161*	-0,0023	0,0041	0	-0,0012	0,0004
5 Estuário da Lagoa dos Patos	0,0871*	0,0049	0,0011	0,01844	0	0,0045
6 Estuário do Rio Mampituba	0,1062*	-0,0104	-0,0077	0,01885	-0,0057	0

* $p < 0,001$

Tabela 4.3. Análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) dos haplótipos da região controle do mtDNA (910 pb) de *Lycengraulis grossidens*. Foram usados dois grupos, indivíduos providos do Rio Uruguai (grupo 1) e todos os demais indivíduos dos 5 locais (grupo 2), veja MM.

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de Variância	Percentual de variação
Entre grupos	1	16,437	0.27988 Va	11,38 %
Entre populações dentro dos grupos	4	8,812	0,00077 Vb	0,03 %
Dentro das populações	191	415,944	2,17771 Vc	88,58 %
TOTAL	196	441,193	2,45837	

Tabela 4.4. Estimativas de migrantes baseada na região controle do DNA mitocondrial (910 pb) de *Lycengraulis grossidens*. Onde, MLE = estimativas de máxima verossimilhança, Nef = número efetivo de fêmeas, Nefm = número efetivo de fêmeas migrantes.

	MLE	Intervalo de confiança 95%	
		Inferior	Superior
Theta Rio Uruguai	0,003074	0,001803	0,005206
Theta Outros locais	0,040231	0,033972	0,048228
Proporção de Migração Rio Uruguai para Outros locais	18,98133	1,195542	72,18686
Proporção de Migração Outros locais para Rio Uruguai	1253,785	596,9406	2292,128
Nef Rio Uruguai	12296	7212	20824
Nef Outros locais	160924	135888	192912
Nefm Uruguai para Outros	0,3818	0,020307	1,740714
Nefm Outros para Uruguai	1,927068	0,538142	5,966409

Tabela 4.5. Inferência biológica dos processos que estão influenciando a variação genética em *Lycengraulis grossidens* numa distribuição geográfica, baseado nos cladogramas aninhados significantes formados na figura 4.4. Apenas cladogramas com permutações significantes para estrutura geográfica constam nesta tabela.

Nível de significância do cladograma	Chave de inferência	Saída
Clado 1-32	1-2-11-17 (Não)	Não conclusivo
Clado 2-3	1-2-3-4-9 (Não)	Fragmentação Alopátrica
Clado 2-5	1-2-3-5-6-7-8 (Sim)	Fluxo restrito de genes
Clado 2-12	1-2-11-17-4-9 (Não)	Fragmentação Alopátrica
Clado 2-13	1-2-11-12 (Não)	Expansão em um intervalo contíguo
Clado 2-14	1-19 (Não)	Fragmentação Alopátrica
Clado 3-3	1-2-11-12-13 (Sim)	Fragmentação passada seguida por Expansão
Clado 3-6	1-2-11-17-4 (Não)	Fluxo restrito de genes com isolamento por distância
Clado 4-2	1-2	Não conclusivo

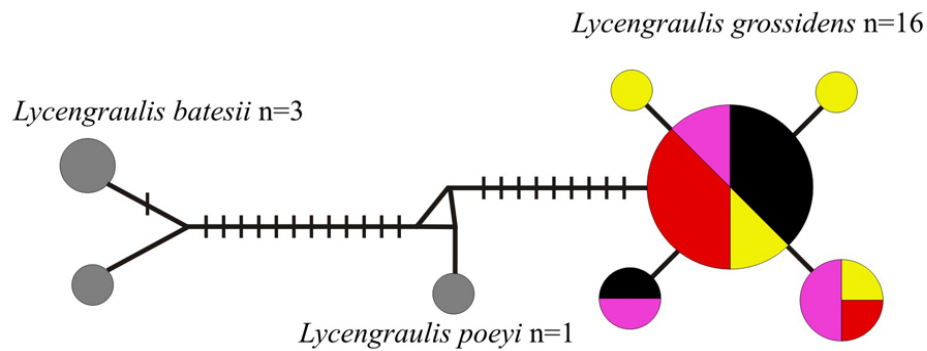


Figura 4.1. Rede de haplótipos da região Citocromo b oxidase (341 pb) do gênero *Lycengraulis*. Em cinza estão *L. batesii* e *L. poeyi*. *Lycengraulis grossidens* provindos do Rio Uruguai (preto), do estuário do Rio da Prata (rosa), do estuário da Lagoa dos Patos (vermelho) e da Lagoa Mirim (amarelo). Algumas sequências foram acessadas do banco de dados genbank (veja MM).

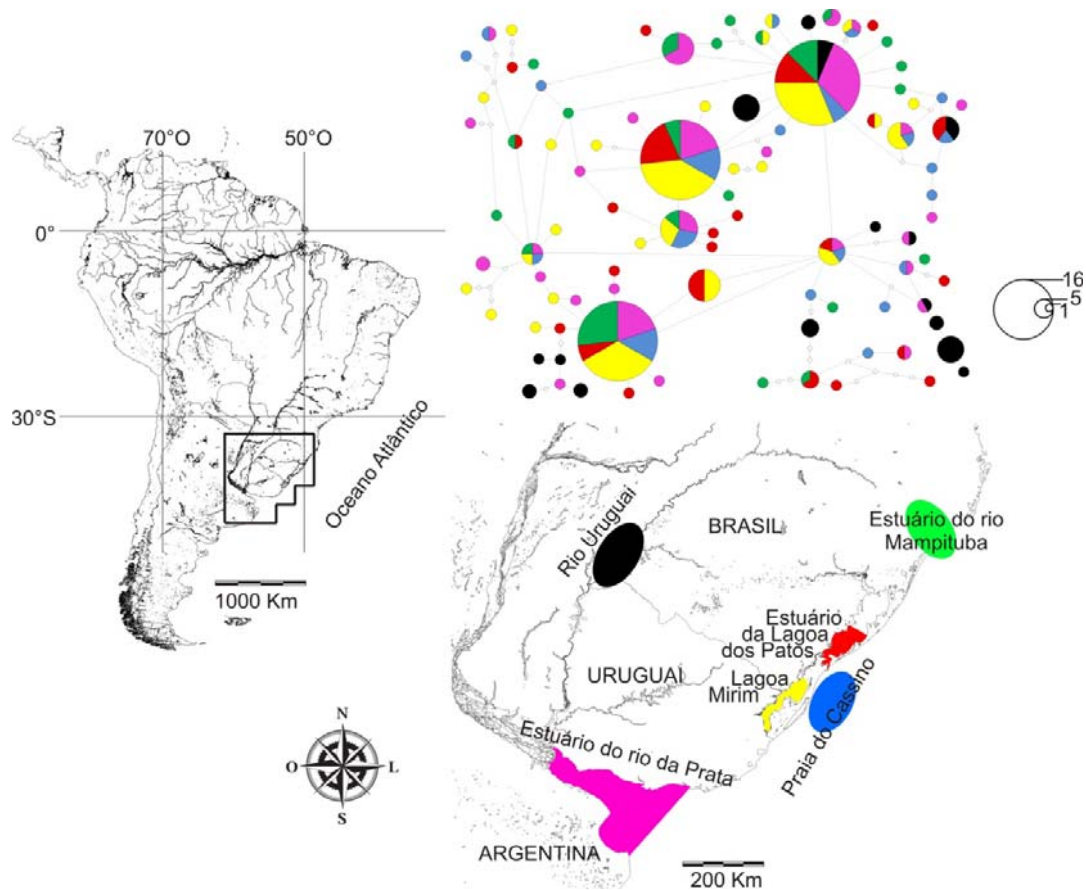


Figura 4.2. Mapa da área de estudo e da rede de haplótipos. A rede de haplótipos foi gerada de acordo com a região controle (910 pb) do mtDNA de *Lycengraulis grossidens*. Nota: o tamanho dos círculos é proporcional à frequência haplotípica; as cores representam indivíduos das diferentes localidades, Rio Uruguai em preto, estuário do Rio da Prata em rosa, Praia do Cassino em azul, Lagoa Mirim em amarelo, estuário da Lagoa dos Patos em vermelho e estuário do Rio Mampituba em verde.

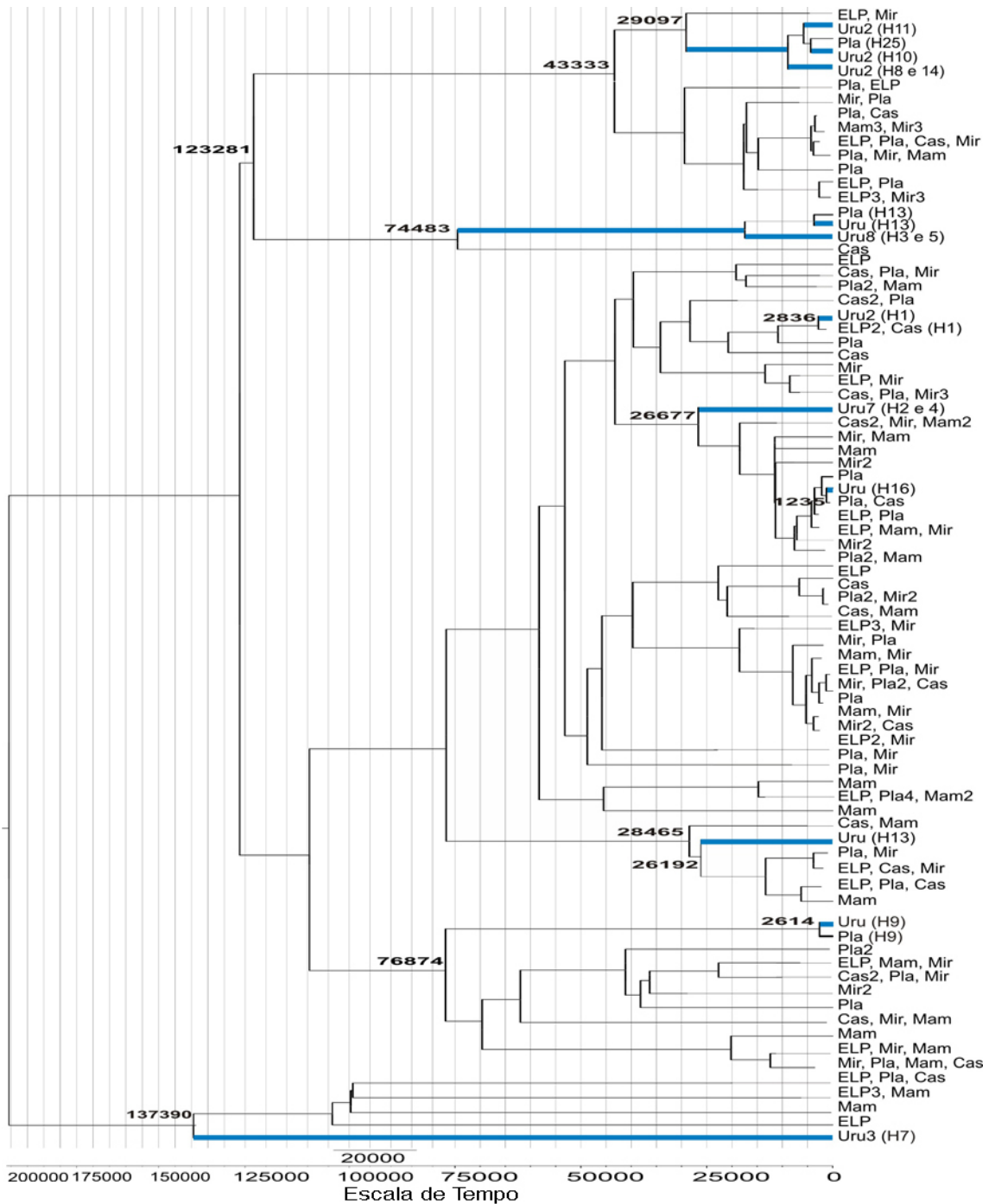


Figura 4.3. Árvore filogenética construída através de IB no programa Beast, com base em 910 pb da região controle do mtDNA. Uru= Rio Uruguai, Pla= estuário do Rio da Prata, Cas= Praia do Cassino, ELP= estuário da Lagoa dos Patos, Mir= Lagoa Mirim e Mam= estuário do Rio Mampituba. Entre parênteses esta o número do haplótipo para os indivíduos do Rio Uruguai, os ramos que contem indivíduos do Rio Uruguai se encontram destacados em azul. Números fora dos parênteses representam o número de indivíduos, quando maiores que um.

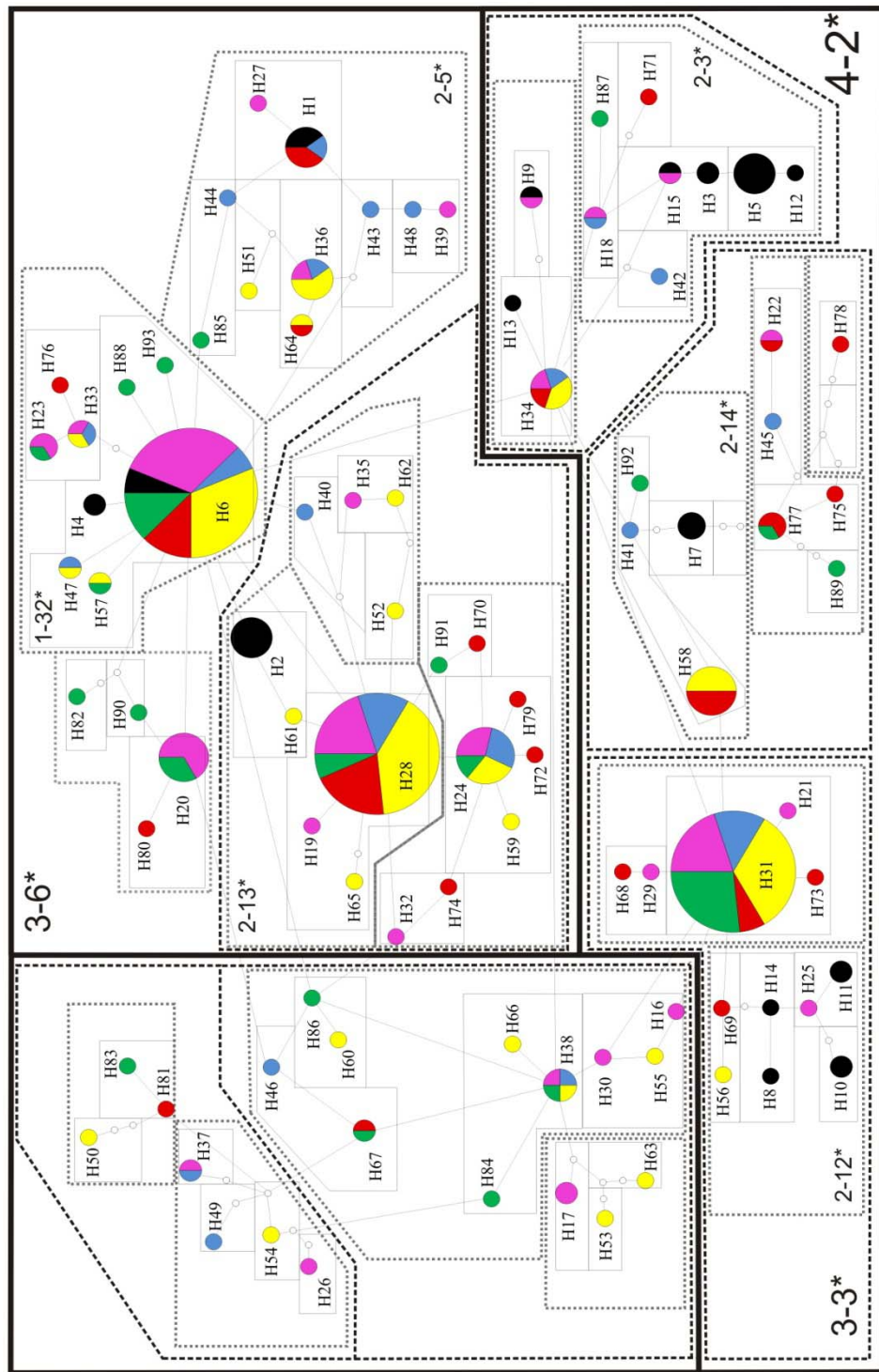


Figura 4.4. Cladograma dos 93 haplótipos identificados em *Lycengraulis grossidens* da região controle do mtDNA. Cada linha corresponde a um passo mutacional. Os círculos menores representam os haplótipos não detectados. Clados aninhados numerados e com asterisco indicam que houve correlação significativa entre distância geográfica e divergência genética identificada nas análises de NCPA. Nota: o tamanho dos círculos as cores seguem o descrito na figura 4.2.

CONCLUSÕES GERAIS DA TESE

Baseado em uma abordagem integrada, envolvendo análise de dados bibliográficos, uso de ferramentas moleculares, e o estudo de elementos químicos do otólito de *L. grossidens*, foi possível elucidar algumas questões importantes sobre a bio-ecologia dessa espécie.

A primeira questão se refere ao uso do habitat por *Lycengraulis grossidens*. Conforme discutido ao longo dessa tese se verificou que o entendimento do ciclo de vida de *L. grossidens* era bastante controverso na literatura, sendo que diversas classificações já foram propostas, incluindo o reconhecimento de populações anádromas, marinha migrantes, catádromas, estuarina residentes, semi-catádromas e residentes de água doce. Os resultados encontrados pelos perfis das razões estrôncio (Sr) e bário (Ba) em relação ao cálcio (Ca) corroboram com dados bibliográficos, revelando uma alta plasticidade de uso do habitat pela espécie. Ela é capaz de usar desde ambientes límnicos a ambientes marinhos por toda a vida. Ou seja, não é possível descartar nenhuma das propostas presentes na literatura, o que classifica *L. grossidens* como uma das espécies bastante adaptável a utilização de um amplo gradiente salino e de temperatura.

Ainda no que tange aos aspectos relacionados ao uso do hábitat da espécie verificou-se a presença de uma variação latitudinal. Com a maioria dos indivíduos amostrados em baixas latitudes em baías marinhas protegidas e no mar apresentando um comportamento estuarino/marinho residente. Enquanto, na porção sul de sua distribuição, a maioria dos indivíduos são caracteristicamente diádromo/nômades.

Por fim, a análise de elementos químicos dos otólitos indicou a existência de uma população restrita ao Rio Uruguai, e de uma parte da população da Lagoa Mirim residente de água doce. Com isto, concluímos que a espécie é capaz de viver toda a vida na água doce, ou no ambiente estuarino/marinho, com alguns indivíduos apresentando diadromia facultativa.

Apesar dos marcadores microssatélites não terem sido utilizados para o estudo de estruturação genética, a publicação dos iniciadores de regiões microssatélites pode ser útil para estudos futuros. Já que estes marcadores são muito utilizados em estudos de diversidade genética, fluxo gênico e estrutura genética de populações. Além disso, nosso trabalho demonstrou que estes iniciadores funcionam em outras espécies de Engraulididae, ou seja, poderão também ser utilizados para estudos populacionais em outras espécies.

Baseados em sequências da região controle do mtDNA, as análises sugerem que a população do Rio Uruguai se encontra semi-isolada geneticamente das demais. Como os haplótipos do Rio Uruguai posicionam-se em regiões periféricas da rede de haplótipos, por ser a população com a menor diversidade haplotípica e nucleotídica, e pelos dados da região do Citocromo b do mtDNA confirmar que *L. grossidens* é irmã de *L. poeyi*, uma espécie marinha. Os resultados, provenientes da região controle do DNA mitocondrial, suportam a hipótese de colonização de *L. grossidens* para a água doce a partir do ambiente marinho/costeiro, em detrimento da hipótese de chegada pelo centro do continente, via afluentes da bacia Amazônica. Outro fato é a ocorrência de *L. grossidens* em outros ambientes límnicos, como no Guaíba, na Lagoa Mirim e no Rosário de Lagoas do norte do Rio Grande do Sul. Essas

invasões também suportam a entrada via conexões entre o mar e a água doce (estuários) da região.

Por fim, nosso trabalho demonstrou que uma população de *L. grossidens* encontra-se estabelecida em água doce, e que este semi-isolamento não é reflexo de uma ação antrópica nas últimas décadas como previamente hipotetizado nesse trabalho. Ou seja, os resultados encontrados através do estudo da região controle do mtDNA revelaram que as entradas vem ocorrendo através de pulsos nos últimos 137 mil anos.

Evidências de fluxo restrito de genes em uma parte da rede de haplótipos aninhada poderiam estar refletindo que diferenças no uso do habitat por parte da população (contingentes) podem estar levando a um semi-isolamento reprodutivo. Todavia, é necessário ressaltar que nossas amostragens não fizeram distinção entre os diferentes contingentes revelados pelas análises de elementos químicos dos otólitos. Assim, não é possível afirmar categoricamente esta hipótese.

Migração ou migração parcial impulsiona a variação espacial e temporal na abundância de organismos e, portanto, pode ter conseqüências ecológicas importantes, embora estudos empíricos a esta questão são raros (Chapman et al. 2012). Estes efeitos ecológicos podem ser divididos em duas categorias: transporte de nutrientes e efeitos tróficos. É reconhecido que espécies diádromas realizam um importante trabalho no transporte de nutrientes entre os ambientes costeiros e os de água doce, e vice-versa (Jonsson and Jonsson 1993, Moore et al. 2004). Mudanças nas assembléias de peixes, com impactos em toda a teia trófica, ocorrem com a chegada ou saída de uma espécie durante os eventos migracionais. No caso específico do *L. grossidens*, quando

juvenis, alimentando-se de zooplâncton, pode contribuir como alimento de espécies ictiófagas. E quando chegam adultos, agora com hábito ictiófago/carcinófago, podem modificar a teia trófica já que são predadores de topo de médio porte.

Esta grande plasticidade de histórias de vida, mudança ontogenética na dieta e padrões individuais de uso do habitat, podem conferir resistência em face de perturbações imprevisíveis que tornam um determinado padrão de uso de habitat insustentável por um período de tempo (Secor 1999, 2007). Resiliência a distúrbios é particularmente importante para espécies diádromas, pois estas enfrentam mudanças antropogênicas em estuários (principalmente poluição), em rios (construção de Barragens e poluição) e pressão pesqueira (McDowall 2007, Chapman et al. 2012). Esta ampla gama de ameaças antrópicas tem contribuído para declínios populacionais em todo o mundo (Jonsson et al. 1999, McDowall 1999, Limburg and Waldman 2009).

Finalmente, como sugestões para abordagens futuras no estudo de *L. grossidens* recomenda-se:

- i) Realizar um estudo integrado com marcadores moleculares e elementos químicos de otólitos, utilizando a Lagoa Mirim como modelo para estudar o fluxo genético entre contingentes. Para esse estudo, primeiramente deve-se efetuar a análise química do otólito de todos os indivíduos e, após reconhecer os diferentes contingentes (residentes e diádromo/nômades) utilizar ferramentas genéticas da região controle do mtDNA afim de demonstrar o possível isolamento genético populacional;

- ii) Testar esta hipótese para outros ambientes como no Rio Paraná, no Rio Guaíba, em Lagoas do norte do Rio Grande do Sul, e na Lagoa Peri (SC);
- iii) Determinar a estruturação genética da espécie ao longo da sua distribuição, utilizando a região controle do mtDNA, ou outros marcadores moleculares, como a região Citocromo b oxidase ou 16S, uma vez que a região controle se mostrou muito diversa, com diversos casos de homoplasia;
- iv) Incluir amostras do Pará e da porção mais ao norte de sua distribuição tanto em estudos de uso do habitat quanto de estruturação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, EM, MIANZAN, H, GUERRERO, R, CARRETO, J, GIBERTO, D, MONTROYA, N & M CARIGNAN. 2008. An overview of physical and ecological processes in the Rio de la Plata Estuary. *Contin. Shelf Res.*, 28: 1579-1588.
- ALBERT, JS & RE REIS. 2011. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California Press, Los Angeles, 388 p.
- ALLENDORF, FW & G LUIKART. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, 663 p.
- ALVERSON, AJ, JANSEN, RK & EC THERIOT. 2007. Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Mol. Phyl. Evol.*, 45: 193-210.
- ARAI, T, OHJI, M & T HIRATA. 2007. Trace metal deposition in teleost fish otolith as an environmental indicator. *Water Air Soil Pollut.*, 179: 255-263.
- AVISE, JC. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York, 511 p.
- BENEDITO-CECILIO, E, AGOSTINHO, AA, JÚLIO-JR, HF & CS PAVANELLI. 1997. Colonização ictiofaunística do reservatório de Itaipu e áreas adjacentes. *Rev. Brasil. Zool.*, 14(1): 1-14.
- BERRA, TM. 2007. Freshwater fish distribution. University of Chicago Press, Chicago, 615 p.
- BLABER, SJM. 2000. Tropical Estuarine Fishes: Ecology, Exploitation, and Conservation. Blackwell Science, Cleveland, 372 p.

- BLOOM, DD & NR LOVEJOY. 2011. The biogeography of marine incursions in South America. In: J. S. Albert, and R. E. Reis, eds. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, CA.
- BLOOM, DD & NR LOVEJOY. 2012. Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). *J. Evol. Biol.*, 25: 701-715.
- BORTOLUZZI, T, ASCHENBRENNER, AC, SILVEIRA, CR, ROOS, DC, LEPKOSKI, ED, MARTINS, JA, GOULART, MG, QUEROL, E & MV QUEROL. 2006. Hábito alimentar da sardinha prata, *Lycengraulis grossidens* (Spix & Agassiz, 1829), (Pisces, Engraulidae), Rio Uruguai médio, sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biodiv.Pampeana*, 4: 11-23.
- BURNS, MDM, GARCIA, AM, VIEIRA, JP, BEMVENUTI, MA, MARQUES, DMLM & V CONDINI. 2006. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.*, 4(1): 69-72.
- BUSOLI, RO & JH MUELBERT. 2003. Environmental factors and Ichthyoplankton dynamics in the surf zone of Cassino sandy Beach (32° 10'S, 52°20'W). *J. Coast. Res.*, 35: 463-471.
- CAMPANA, SE & JD NEILSON. 1985. Microstructure of fish otolith. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1014-1032.
- CARVALHO-FILHO, A. 1999. *Peixes: costa brasileira*. Editora Melro, São Paulo, 318 p.

- CHAO, LH, PEREIRA, LE & JP VIEIRA. 1985. Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study. In: YANEZ-ARANCIBIA, A (ed.). *Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration*. DR(R) UNAM Press, Mexico, Chap. 20: 429-450.
- CHAPMAN, BB, SKOV, C, HULTHÉN, K, BRODERSEN, J, NILSSON, PA, HANSSON, L-A & C BRÖNMARK. 2012. Partial migration in fishes: definitions, methodologies and taxonomic distribution. *J. Fish Biol.*, 81: 479-499.
- CIRANO, M & GC LESSA. 2007. Oceanographic characteristics of baía de Todos os Santos, Brazil. *Rev. Brasil. Geofísica*, 25(4): 363-387.
- COIMBRA, JC, CARREÑO, AL, GERAQUE, EA & BB EICHLER. 2007. Ostracodes (Crustacea) from Cananéia-Iguape estuarine/lagoon system and geographical distribution of the mixohaline assemblages in southern and southeastern Brazil. *Iheringia*, 97(3): 273-279.
- DARLINGTON, PJ. 1957. *Zoogeography: The Geographical Distribution of Animals*. John Wiley & Sons, Inc, New York, 561 p.
- ELLIOTT, M, WHITFIELD, AK, POTTER, IC, BLABER, SJM, CYRUS, DP, NORDLIE, FG & TD HARRISON. 2007. The guild approach to categorizing estuarine fish assemblages: a global review. *Fish Fish.*, 8: 241-268.
- ELSDON, TS, WELLS, BK, CAMPANA, SE, GILLANDER, BM, JONES, CM, LIMBURG, KE, SECOR, DH, THORROLD, SR & BD WALTHER. 2008. Otolith chemistry to describe movement and life-history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. In: GIBSON,

- RN, ATKINSON, RJA & JDM GORDON (Eds.). Oceanography and Marine Biology: An Annual Review. Taylor & Francis, Oxon, Chap. 46: 297-330.
- FROESE, R & D PAULY. 2013. FishBase. World Wide Web electronic publication www.fishbase.org. Acessado em 10/05/2013
- FUSTER DE PLAZA, ML & EE BOSCHI. 1961. Areas de migracion y ecologia de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en las aguas argentinas (Pisces, fam. Engraulidae). *Faculdat de Ciencias Exactas y Naturales*, 1(3): 127-183.
- GARCIA, AM, VIEIRA, JP & KO WINEMILLER. 2003. Effects of 1997-1998 El Niño on the dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon Estuary (Brazil). *Est. Coast. Shelf Sci.*, 57: 489-500.
- GOULART, MG, ASCHENBRENNER, ADC, BORTOLUZZI, T, SILVEIRA, CDRD, LEPKOSKI, ED, MARTINS, JA, BRANDLI, EDS, ROOS, DC, QUEROL, E & MV QUEROL. 2007. Análise do crescimento de escamas de *Lycengraulis grossidens* (AGASSIZ, 1829), em populações da bacia do Rio Uruguai médio, Rio Grande do Sul. *Biodivers. Pampeana*, 5(1): 3-8.
- HELLBERG, ME. 2009. Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40: 291-310.
- HUANG, Z, XU, X, TANG, J, ZHANG, J, ZHENG, J, LI, G & J HE. 2009. Application and primer design of mitochondrial DNA D-loop of freshwater fishes. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*: 1-4.
- JONSSON, B, WAPLES, RS & KD FRIEDLAND. 1999. Extinction considerations for diadromous fishes. *ICES J. Mar. Sci.*, 56: 405-409.

- JONSSON, B & N JONSSON. 1993. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 3: 348–365.
- KRUMME, U, SAINT-PAUL, U & ROSENTHAL, H. 2004. Tidal and diel changes in the structure of a nekton assemblage in small intertidal mangrove creeks in northern Brazil. *Aquat. Living Resour.*, 17: 215-229.
- LEE, CE & MA BELL. 1999. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 284-288.
- LIAO, X, SHAO, CW, TIAN, YS & SL CHEN. 2007. Polymorphic dinucleotide microsatellites in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther). *Mol. Ecol. Notes*, 7(6): 1147-1149.
- LIMBURG, KE & JR WALDMAN. 2009. Dramatic declines in North Atlantic diadromous fishes. *Bioscience* 59: 955-965.
- LIU, J-X, GAO, T-X, ZHUANG, Z-M, JIN, X-S, YOKOGAW, K & Y-P ZHANG. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Mol. Phylog. Evol.*, 40(3): 712-723.
- LOGARES, R, BRATE, HEINRICH, J, F, SHALCHIAN-TABRIZI, K & S BERTILSSON. 2010. Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11). *Mol. Biol. Evol.*, 27: 347-357.
- LUCENA, CAS, JARDIM, AS & ES VIDAL. 1994. Ocorrência, distribuição e abundância de peixes na praia de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol.*, 7: 3-27.

- MASTRARRIGO, V. 1947. La sardinha de la cuenca del Río de la Plata (*Lycengraulis olidus*) (Günther). Ministerio de Agricultura. Publ. 249, Direc. de Pisc. Pesca y Caza Marítima: 1-11.
- MCDOWALL, RM. 1999. Different kinds of diadromy: Different kinds of conservation problems. *ICES J. Mar. Sci.*, 56: 410-413.
- MCDOWALL, RM. 2007. On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. *Fish Fish.*, 8: 1-13.
- MONT'ALVERNE, R, MORAES, LE, RODRIGUES, FL & JP VIEIRA. 2012. Do mud deposition events on sandy beaches affect surf zone ichthyofauna? A southern Brazilian case study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 102-103: 116-125.
- MOORE, JW, SCHINDLER, DE & MD SCHEUERELL. 2004. Disturbance of freshwater habitats by anadromous salmon in Alaska. *Oecologia*, 139: 298-308.
- MOURA, PM, VIEIRA, JP & AM GARCIA. 2012. Fish abundance and species richness across an estuarine-freshwater ecosystem in the Neotropics. *Hydrobiologia*, 696: 107-122.
- O'REILLY, P & JM WRIGHT. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its applications to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47: 29-55.
- OLDANI, NO, BAIGÚN, CRM, NESTLER, JM & GOODWIN, RA. 2007. Is fish passage technology saving fish resources in the lower La Plata River basin? *Neotrop. Ichthyol.*, 5(2): 89-102.
- OLIVEIRA, AG. 1997. Dinâmica populacional de *Lycengraulis grossidens* Agassiz 1829 nas lagoas Itaperava e quadros, subsistema Norte de

- lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil (Teleostei, Engraulididae).
Dissertação, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, 109 p.
- OLIVEIRA, EC. 2008. Ictiofauna da face norte da ilha rasa da cotinga, Baía de Paranaguá, Paraná: composição, estrutura da assembléia e reprodução.
Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 164 p.
- POTTER, IC, TWEEDLEY, JR, ELLIOTT, M & AK WHITFIELD. 2013. The ways in which fish use estuaries: a refinement and expansion of the guild approach. *Fish Fish.*, doi: 10.1111/faf.12050.
- RAMOS, LA. 2005. Auto-ecologia de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Clupeiformes, Engraulididae) em estuários do Rio Grande do Sul e sua pesca na barra do rio Tramandaí, RS, Brasil. Tese de Doutorado.
Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 135 p.
- REIS-FILHO, JA, NUNES, JDACDC & A FERREIRA. 2010. Estuarine ichthyofauna of the Paraguaçu River, Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Biota Neotrop.*, 10(4): 301-311.
- RODRIGUES, FL & JP VIEIRA. 2012. Surf zone fish abundance and diversity at two sandy beaches separated by long rocky jetties. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 93: 1-9.
- SÁNCHEZ-BOTERO, JI, CARAMASCHI, EP & DS GARCEZ. 2008. Spatiotemporal variation in fish assemblage in a coastal lagoon without direct contact with the sea (Southeastern Brazil). *J. Coast. Research* 24(4C): 225-238.
- SEELIGER, U & C ODEBRECHT. 2010. O Estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. FURG, Rio Grande, 180 p.

- SECOR, DH. 1999. Specifying divergent migrations in the concept of stock: the contingent hypothesis. *Fish. Res.*, 43: 13-34.
- SECOR, DH. 2007. The year-class phenomenon and the storage effect in marine fishes. *J. Sea Res.*, 57: 91-103.
- SEELIGER, U, ODEBRECHT, C & JP CASTELLO, 1997. Subtropical Convergence Environments: The Coast And Sea In The Southwestern Atlantic. Springer-Verlag, Berlim, 308 p.
- SILVA, MA. 2006. Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) ao longo da costa brasileira. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Niterói, 107 p.
- TABATA, K & N TANIGUCHI. 2000. Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis. *Fish. Science*, 66(1): 9-18.
- TAUTZ, D, ARCTANDER, P, MINELLI, A, THOMAS, RH & AP VOGLER. 2003. A plea for DNA taxonomy. *TRENDS Ecol. Evol.*, 18(2): 70-74.
- VASCONCELOS-FILHO, ADL & AME OLIVEIRA. 1999. Composição e ecologia da ictiofauna do Canal de Santa Cruz (Itamaracá – PE, Brasil). *Trab. Ocean. UFPE*, 27(1): 101-113.
- VERMEIJ, GJ & R DUDLEY. 2000. Why are there so few evolutionary transitions between aquatic and terrestrial ecosystems? *Biol. J. Linnean Soc.*, 70:541-554.
- VERMEIJ, GJ & FP WESSELINGH. 2002. Neogastropod molluscs from the Miocene of western Amazonia, with comments on marine to freshwater transitions in molluscs. *J. Paleont.*, 76:265-270.

- VIEIRA, JP, GARCIA, AM & L MORAES. 2010. A assembléia de peixes. In: SEELIGER, U & C ODEBRECHT (Eds.). O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. FURG, Rio Grande, 77-88.
- VILAR, CC, SPACH, HL & JC JOYEUX. 2011. Spatial and temporal changes in the fish assemblage of a subtropical estuary in Brazil: environmental effects. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 91(3): 635-648.
- VRIES, MC, GILLANDERS, BM & TS ELSDON. 2005. Facilitation of barium uptake into fish otoliths: Influence of strontium concentration and salinity. *Geoch. Cosmoch. Acta*, 69(16): 4061-4072.
- WARD, RD, COSTA, FO, HOLMES, BH & D STEINKE. 2008. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquat. Biol.*, 3: 71-78.
- WEISS, G & LC KRUG. 1977. Características do desenvolvimento e metamorfose de *Lycengraulis olidus* (Engraulidae) e *Brevoortia pectinata* (Clupeidae) no estuário da lagoa dos Patos, Brasil. *Atlântica*, 2(1): 83-117.
- WEISS, G. 1981. Ictioplancton del estuario de Lagoa dos Patos, Brasil. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de La Plata, Mar del Plata, 164 p.
- WHITEHEAD, PJP, NELSON, GJ & T WONGRATANA. 1988. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. FAO Fish Synopsis, Rome.
- WHITFIELD, AK, PANFILI, J & J-D DURAND. 2012. A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus 1758 (Teleostei:

Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 22(3): 641-681.

WINEMILLER, KO & MA LESLIE. 1992. Fish assemblages across a complex, tropical freshwater/marine ecotone. *Environ. Biol. Fish.*, 34: 29-50.

ZANE, L, BARGELLONI, L & T PATARNELLO. 2002. Microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.*, 11: 1-16.

Anexo I

**Review and consideration on habitat use, distribution
and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz,
1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae)**

Ana C. G. Mai • João P. Vieira

Publicado: Biota Neotropica

**Review and consideration on habitat use, distribution
and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829)
(Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae)**

Ana Cecilia Giacometti Mai^{1,2} & João Paes Vieira¹

¹Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Av. Itália, Km 8, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

²Corresponding author: Ana Cecilia Giacometti Mai, e-mail: anacecilia_mai@yahoo.com.br

MAI, A.C.G. & VIEIRA, J.P. **Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae)**. Biota Neotrop. 13(3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n3/en/abstract?article+bn02713032013>

Abstract: In this paper, we present a summary of the current knowledge of *Lycengraulis grossidens*, a widely distributed coastal fish that occurs from Belize to Argentina. This species is abundant in estuaries along the Southwest Atlantic Coast and is important for recreational fishing, and as bycatch of shrimp fisheries. We compiled data available on taxonomy, phylogeny, ecology, fisheries and organized conceptually the life cycle of the species according to modern estuarine-use classification. Our review showed that along its geographic distribution and inside some particular environments (i.e., estuaries and costal lagoons) the species have been classified in a variety of ways in order to describe the remarkable complexity of habitat use that varies from freshwater resident, anadromous, marine migrant, estuarine resident, marine stragglers, catadromous to semi-catadromous. We conclude that *L. grossidens* is able to reproduce either in freshwater or estuarine water and postulate that it has a high plasticity in habitat use and life history, with migratory and resident contingents in the same local population. There seems to be a latitudinal change in migratory behavior of this species along the South America Coast, prevailing anadromous or semi-anadromous pattern at higher latitudes and marine migrants at the tropical northeast coast of Brazil.

Keywords: contingents, estuarine resident, anadromous, catadromous, freshwater resident, review:

MAI, A.C.G. & VIEIRA, J.P. **Revisão e considerações sobre o uso do habitat, distribuição e história de vida de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae)**. Biota Neotrop. 13(3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n3/pt/abstract?article+bn02713032013>

Resumo: Neste trabalho é apresentada uma compilação do conhecimento atual de *Lycengraulis grossidens*, uma espécie de peixe amplamente distribuído pela costa oeste do Atlântico Sul, ocorrendo de Belize a Argentina. Esta espécie é abundante nos estuários e tem importância na pesca recreacional além de sofrer impacto da pesca do camarão. São revisados dados publicados sobre a taxonomia, filogenia, ecologia, pesca e ciclo de vida da espécie. Nossa revisão mostrou que, ao longo de sua distribuição, a espécie tem sido classificada de várias formas na tentativa de descrever seu uso do habitat, desde residentes de água doce, anádromos, marinhos migrantes, estuarinos residentes, catádro e semi-catádro. Conclui-se que a espécie é capaz de se reproduzir em água doce ou salgada, com uma alta plasticidade no uso do habitat e na sua história de vida, com componentes migrantes e residentes no mesmo local. Além disso, parece haver uma mudança no comportamento migratório da espécie em diferentes latitudes, mostrando um padrão anádromo ou semi-anádromo nas maiores latitudes e marinhos migrantes ao longo da costa tropical do Brasil.

Palavras-chave: contingentes, estuarino residente, anádromo, catádro, residente de água doce, revisão.

Introduction

Engraulidae are usually found in schools, and many species are important fisheries resources, playing a relevant role as primary consumers (Berra 2007). Currently, sixteen genera of Engraulidae are recognized (Froese & Pauly 2011). Anchovies are primarily marine fishes, but in South America there are 12+ species that occur in major tropical rivers (Berra 2007, Bloom & Lovejoy 2012).

Different from other western Atlantic anchovies, the genus *Lycengraulis* has canine-like teeth, i.e., sharp and conical teeth of different sizes which are distinct from other Engraulidae that have filiform teeth (Whitehead et al. 1988). Currently, the genus comprises four species, one restricted to the western coast of the Americas (*Lycengraulis poeyi* (Kner & Steindachner, 1865)), and three inhabiting the east coast of the Neotropical region (*Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829), *Lycengraulis batesii* (Günther, 1868) and *Lycengraulis limnichthys* (Schultz, 1949)). *Lycengraulis batesii* occurs to the west of Central and South Atlantic Ocean (Orinoco River, Manacacias River, rivers of the Guianas, and Amazon River) (Whitehead et al. 1988) and *L. limnichthys* inhabits Cartagena Bay and Maracaibo Bay, Venezuela (Nizinski & Munroe 2002). *Lycengraulis grossidens* is recognized to be widely distributed in the coastal zone from Belize to Argentina, including freshwater populations (Whitehead et al. 1988).

Lycengraulis grossidens can be characterized by a combination of characters as following: body fairly elongate and compressed, varying in depth 3.85-4.4 times in standard length (Schultz 1949, Whitehead et al. 1988). Snout pointed, projecting, a notch in the upper jaw, mouth large, maxillary ending below middle of pre-operculum (Jordan & Seale 1926) (Figure 1). Dorsal fin origin sits at midway between end of the caudal vertebra and the posterior margin of the eye, its longest ray scarcely equal to the base of the fin, being equal to head posterior of eye; origin of anal fin under ninth dorsal ray. Head 4.5 times in standard length. Eye a third more than snout, which is 4.7 of head. Cycloid scales that detach easily for its body. It presents four gill arches and a pseudobranchia (Jordan & Seale 1926, Fuster de Plaza & Boschi 1961). Species can reach up to 300 mm in total length (Carvalho-Filho 1999). Number of vertebrae range from 42 to 48. Dorsal fin rays have 12-18, pectoral 13-17, ventral always have 7 and, anal range from 21-30. Number of gillrakers on upper anterior arch range from 11-20 and in lower 16-25 (Jordan & Seale 1926, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Silva 2006). It has fusiform otolith, posterior margin lobed and anterior margin finished in notch, ventral margin dentate (Figure 2). Ventral height up to 3.15 and excisural notch up to 4.2 times the length of the otolith. Ventral height up to 1.75 times the length of the otolith. Rostrum and antirostrum present (Lemos et al. 1995). Comparison of the numeric characters reveals no sexual differences (Fuster de Plaza & Boschi 1961). Species can be distinguished for *Lycengraulis batesii* that possess less lower gillrakers (12 to 15), being the anterior 1 to 3 rudimentary in larger fish (Whitehead et al. 1988). *Lycengraulis limnichthys* has less vertebrae (39 to 42), and more lower gillrakers (19 to 23) (Whitehead et al. 1988, Nizinski & Munroe 2002).



Figure 1. *Lycengraulis grossidens*, photograph taken of a live specimen at Solis Grande, Uruguay.

<http://www.biotaneotropica.org.br>

Lycengraulis grossidens is among the 10 most abundant species in the larger La Plata River, Patos Lagoon and Paranaguá Bay Estuaries (Spach et al. 2004, Oliveira 2008, Barletta et al. 2010, Vieira et al. 2010), and has economic importance for artisanal fisheries in Argentina, Uruguay and southern Brazil (Fuster de Plaza & Boschi 1961, Castello 1985, Spinetti et al. 2002, Ramos 2005).

This review is important because it brings a comparative vision of habitat use through the latitudinal gradient of distribution of *L. grossidens*, raising new highlights on this context, and we focused our review and conclusions on habitat use and migration, since this is a controversial issue and crucial part of the life cycle of this species.

Material and Methods

More than a century of literature (since Evermann & Kendall 1906 to several authors at 2012) was extensively reviewed. Published papers used in this review were obtained from "Periódicos Capes" (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>), Science direct (<http://www.sciencedirect.com/>) and Google Scholar (<http://scholar.google.com.br/>). We also included the Brazilian Digital Library of Theses and Dissertations (<http://bdtd.ibict.br/>) and "Plataforma Lattes" (<http://lattes.cnpq.br/>) for grey literature (unpublished theses, dissertations and monographs in Brazil). In addition, we obtained complementary material, which was not available online, by contacting researchers using electronic correspondence. Searches were conducted using the keyword "Lycengraulis" and the aim was to obtain current data available regarding phylogeny, distribution, diet, fisheries, growth, reproduction, and migration movements of *Lycengraulis grossidens*.

Based on the records of occurrence from Fishbase (Froese & Pauly 2011) and from original publications, we constructed a distribution map using the program Diva-Gis (available in: <http://www.diva-gis.org/>). Whenever the data was available, latitudinal variations of species parameters were included. The meristic data are presented as follows: amplitude and the most often observed values in brackets.

In order to standardize the terms used for habitat use and migrations, we used the classification of estuarine-use functional groups proposed by Elliott et al. (2007) in addition to the freshwater component not observed in the original classification of Elliott et al. (2007).

Results

Our literature review were able to find a total of 93 published works on *L. grossidens* which was distributed into 64 papers, 15 books, 13 gray literature (thesis, dissertations, conference proceedings and reports), and one website. Our survey period encompassed studies dated from 1906 to 2012. Most studies reviewed (43) are focused on studies related to ecology of fishes communities, 14

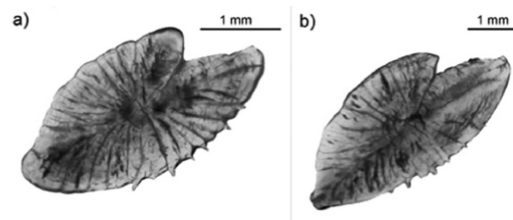


Figure 2. Photograph of sagitta otoliths of *Lycengraulis grossidens*, Iguape, SP: a) 129 mm total length (TL) individual and; b) 260 mm TL individual. Stereomicroscope Nikon SMZ 1500, with HR Plan Apo 1x WD54 lens coupled to digital camera Nikon Digita sight DS F11.

<http://www.biotaneotropica.org.br/v13n3/en/abstract?article=bn02713032013>

works deal specifically with the species of interest, 11 surveys were focused on by-catch of shrimp fisheries, and 25 surveys comprise others areas of knowledge.

1. Phylogenetic relationships

Grande & Nelson (1985) reviewed the entire family Engraulidae and divided into two clades: the first clade, the subfamily Coilinae, comprises six Indo-Pacific genera; and the second lineage, the subfamily Engraulinae comprises the Indo-Pacific marine genera *Encrasicholina* and *Stolephorus*, the worldwide, temperate-distributed genus *Engraulis*, and the so-called “New World anchovies” that include the genera *Anchoa*, *Anchoviella*, *Anchovia*, *Cetengraulis*, *Jurengraulis*, *Lycengraulis* and *Pterengraulis*. These authors believed that taxonomic arrangement of the freshwater South American species were the result of multiple independent transitions from a marine environment.

The currently recognized molecular phylogenetics arrangement of New World anchovies suggest that fresh water South America species are the product of a single evolutionary transition from a marine to freshwater environment (Bloom & Lovejoy 2012). Thus, *L. grossidens* derived from freshwater lineages, where *Jurengraulis juruensis* was the basal lineages, the topology is fully resolved as follows: (*Jurengraulis*, (*Amazonsprattus*, (*Anchoviella*, (*Pterengraulis*, (*Lycengraulis batesii*, (*L. poeyi*, *L. grossidens*)))))) (Bloom & Lovejoy 2012).

2. Ecology

2.1. Species distribution

In freshwater and estuarine environments, the species have been recorded in Bela Vista (Prov. de Corrientes, AR), Rosário (Prov. de Santa Fé, AR), Negro River, Mar Chiquita and Buenos Aires (Prov. Buenos Aires, AR), Paraná River (until Itaipu Dam, AR), Uruguay River, Patos Lagoon, Peixe Lagoon, Tramandai Lagoon (Rio Grande do Sul state, BR), Babitonga Bay (Santa Catarina state, BR), Paranaguá (Paraná state, BR), Iguape, Imbituba (São Paulo state, BR), Imboassica Lagoon (Rio de Janeiro state, BR), Vitória Bay, Doce River (Espírito Santo state, BR), Parnaíba River (Piauí state, BR), Negro River (Amazonas state, BR) and Orinoco and Maracaibo Rivers (Venezuela) (Evermann & Kendall 1906, Hildebrand 1943, Menezes 1950, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Vieira et al. 1996, Benedito-Cecilio et al. 1997, Saint-Paul et al. 2000, Saad et al. 2002, Joyeux et al. 2004, Cervigón 2005, Ramos 2005, Bortoluzzi et al. 2006, Burns et al. 2006, Queiroz et al. 2006, Loebmann et al. 2008, Sánchez-Botero et al. 2008, Costa & Souza-Conceição 2009) (Figure 3).

In saltwater, the species have been recorded in Mar de Ajó, Mar del Plata, Necochea, Orense, Quequé Salado, Monte Hermoso, Bahía Blanca, and Carnem de Patagones, Argentina; Montevideo, Uruguay; Rio Grande (Rio Grande do Sul state; BR), Caravelas (Bahia state), Tamandaré, Itamaracá, Itapissuma (Pernambuco state), Cajueiro da Praia (Piauí state), Brazil; Guiana; French Guiana; Trinidad and Tobago; Venezuela; Colombia; Suriname and Belize (Schultz 1949, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Valdez & Aguilera 1987, Whitehead et al. 1988, Albuquerque 1994, Santos et al. 1998, Kullender & Ferraris 2003, Cervigón 2005, Guedes et al. 2005, Silva 2006, Lira & Teixeira 2008, Santos et al. 2008, Mai et al. 2012) (Figure 3).

2.2. Population Structure

Based on morphological and meristic characteristics, the distribution of the species was divided into four distinct populations

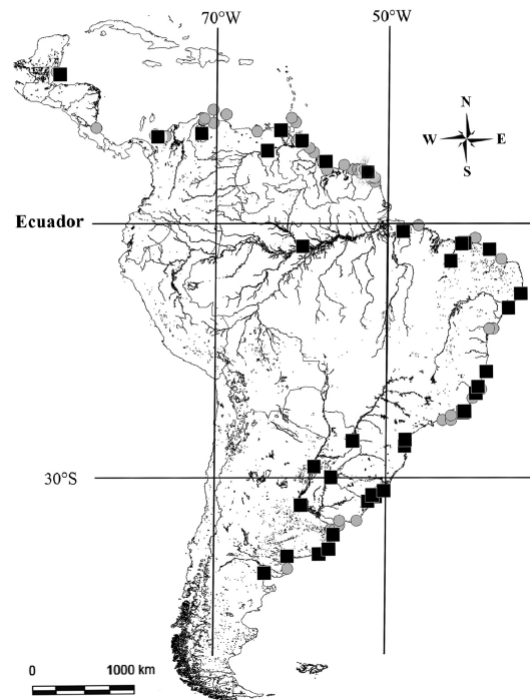


Figure 3. Distribution records of *Lycengraulis grossidens* plotted on a hydrographic map of Central and South America. Black squares showing locations of occurrence described in the literature reviewed, and gray circles are data available in Fishbase (Froese & Pauly 2011).

along the Brazilian Coast (Silva 2006): one from Pará, another from Ceará to Espírito Santo, the third between Rio de Janeiro and São Paulo, and the last one extended between the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul. Silva (2006) reports that the number of gillrakers was the meristic character that showed the clearest pattern of longitudinal variation, with values increasing with increasing latitude.

3. Fisheries

Fisheries of *L. grossidens* have been recorded in Argentina and Uruguay (Fuster de Plaza & Boschi 1961, Spinetti et al. 2002, Baigún et al. 2003). At Maldonado (Uruguay), they are commercialized frozen and used as bait for recreational rod fishing (personal observation). Captures in the estuarine region of the Patos Lagoon by artisanal fishery, between 1974-1979, reached almost 9 ton/year (Castello 1985). Marques (1997) estimated that *L. grossidens* is bycatch of the shrimp fishery at the Patos Lagoon Estuary might have reached almost 30 ton/year. The species is also a component of the artisanal fisheries of the Casamento Lagoon, in the Patos Lagoon system, Rio Grande do Sul state - RS (Milani & Fontoura 2007). Rod, hook and line recreational fishing of this species is an important vocational tourist attraction in the estuarine area of the Tramandaí River, RS, Brazil, totalizing almost 1 ton/year (Ramos 2005).

Along the Brazilian Coast, the species has been recorded as bycatch of shrimp fishery in the south (Haimovici & Mendonça 1996, Vieira et al. 1996, Bail & Branco 2003, Branco & Verani

2006, Loebmann & Vieira 2006, Vianna & D'Incao 2006, Dumont & D'Incao 2011), and in the northeast (Albuquerque 1994, Santos et al. 1998, Santos et al. 2008).

4. Life history

4.1. Reproductive aspects

Lycengraulis grossidens is a split spawning species (Oliveira 2008) and has mean fecundity of 3,752 oocytes (minimum: 2,371, maximum: 6,847) (Oliveira 1997). The species spawns at austral spring and summer (Table 1). Reproductive activity was reported in freshwater (Paraná River, AR), approximately 800 km from the sea, and also in Uruguay River, BR, about 550 km from the sea (Mastrarrigo 1947, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Oliveira 1997, Lepkoski et al. 2005). Reproductive activity was reported also in estuarine conditions in coastal lagoons and estuaries of southern Brazil (Ramos 2005, Oliveira 2008) (Table 1).

Information on length at first maturity was achieved only in the southern part of its distribution (below 30 °S), and revealed that sexual maturity occurs between 80 and 133 mm TL (Mastrarrigo 1947, Fuster de Plaza & Boschi 1961, Oliveira 1997, Ramos 2005) (details in Table 1).

4.2. Development and Growth

The eggs of *L. grossidens* are planktonic with an ovoid shape (eccentricity from 1.25 to 1.5), transparent, without oil drop, with vitellum divided between the alveoli and small perivitelline space (Weiss & Krug 1977). Egg diameter ranges from 1.026 to 1.215 µm along the major axis, and from 756 to 945 µm along the minor axis, and egg volume ranges from 0.338 to 0.568 mm³ (Weiss et al. 1976).

The newly hatched larva measures approximately 3 mm of total length (TL), is transparent and without any pigmentation, the vitellum has a granular aspect and the yolk-sack is oval-shaped, extending from the inferior part of the head to the middle of the body (Weiss & Krug 1977). The juvenile, at 40 mm TL, contains adult characteristics and growth changes from allometric to isometric. At this phase in the development, the body proportions, fin disposition, and rays are already definitive, the digestive system is complete, and the first scales are developed (Weiss & Krug 1977). The development time from egg to juvenile is not yet known.

Castello & Krug (1978) inferred the age of *L. grossidens* from the Patos Lagoon Estuary (Brazil) based on the reading of *sagitta*

otolith rings. They suggest that individuals from 70-100 mm total length (TL) are one year old, 100-130 mm TL are two years old, and they analyzed only one individual measuring 210 mm TL, suggesting an age of three years. Goulart et al. (2007), using scales to infer ages of *L. grossidens* collected from the Uruguay River, assumed that individuals from 100 to 140 mm TL have one ring per year of age and they found individuals of up to three years old.

Goulart et al. (2007) proposed the von Bertalanffy growth function for each year of their study, were: for female length: $LT = 26(1 - e^{0.266(t - (-2.19))})$ and $LT = 26(1 - e^{0.59(t - (-0.12))})$; and for male length: $LT = 26(1 - e^{0.12(t - (-0.69))})$ and $LT = 26(1 - e^{0.42(t - (-0.69))})$.

4.3. Diet and feeding strategies

Lycengraulis grossidens presents a generalist feeding strategy (Ramos 2005) feeding mainly on Insecta, Crustacea, Mollusca, Polychaeta and, Osteichthyes (Froese & Pauly 2011). Although juveniles feed on invertebrates, feeding mainly on zooplankton, when they reaches approximately 140 mm, adults undergo a change in diet and become ichthyophagous (Ramos 2005, Oliveira 2008, details in Table 2).

5. Functional groups and habitat use

Lycengraulis grossidens inhabits marine, estuarine or freshwater environments (Whitehead et al. 1988, Barletta et al. 2010). Except for "freshwater species", several classifications of functional groups related to estuarine use have been proposed: anadromous, marine migrant, estuarine resident, marine stragglers, catadromous and semi-catadromous, and were standardized according to Elliott et al. (2007) in Table 3.

Studies performed in La Plata River (AR) and its tributaries classified *L. grossidens* as anadromous, reporting that the species, during the autumn and early winter, penetrates the "Río de la Plata" and other rivers of the La Plata basin to spawn in fresh water (Paraná River) in September and October, returning to the marine environment in November and December (Mastrarrigo 1947, Fuster de Plaza & Boschi 1961).

The presence of a large number of eggs and larvae and the absence of newly fertilized eggs in the estuarine region near Patos Lagoon, southern Brazil, led Weiss & Krug (1977) and Weiss (1981) to misleadingly hypothesize that *L. grossidens* spawn in coastal waters and behave as catadromous. Later, Ramos (2005), based on the abundance of juveniles and adults from bottom trawl and beach

Table 1. Reproductive aspects of *Lycengraulis grossidens*. L50 is the length where 50% of individuals were mature. References: 1 Oliveira (2008), 2 Oliveira (1997), 3 Ramos (2005), 4 Weiss (1981), 5 Mastrarrigo (1947), 6 Fuster de Plaza & Boschi (1961), and, 7 Lepkoski et al. (2005). – data not reported and * average length at which the peak of the first reproductive cycle is reached (Bervian & Fontoura 1994).

Localities	Reproductive peaks	Spawning site	L50 (total length)	Ref.
Paranaguá Bay, Paraná, Brazil	Spring	Spawning in estuaries	-	1
Itapeva and Quadros Lagoons, Rio Grande do Sul (RS), Brazil	October to January, with peak in December	Spawning in fresh water	80 mm*	2
Patos Lagoon, RS, Brazil	September to January, spawning is related to the increase in water temperature	Spawning in estuaries	112 mm to female and 133 mm to male	3
Patos Lagoon, RS, Brazil	-	Spawning in marine, salt water	-	4
Paraná River, Argentina	October to November, when the water reaches temperatures above 21°C	-	120 mm	5
Parana River, Argentina	October to November, when the water reaches temperatures between 20-24°C	Spawning in small streams, fresh water.	120 mm	6
Uruguay River, RS, Brazil	October to December, with peak in October	Spawning in fresh water	-	7

Table 2. Diet of *Lycengraulis grossidens* based on data available in the literature. N values represent the number of individuals analyzed in each study. References: 1 Lopes (1998), 2 Eskinazi (1972), 3 Lopes & Resende (2000), 4 Oliveira (1997), 5 Ramos (2005), 6 Mastrarrigo (1947), 7 Bortoluzzi et al. (2006) and, 8 Fuster de Plaza & Boschi (1961). – data not reported.

Localities	N	Empty	Diet / Items	Ref.
Itamaracá Island, Pernambuco (PE), Brazil	138	10.9%	Crustacea Peracarida Amphipoda, Isopoda and Tanaidacea; Decapoda Dendrobranchiata, and Pleocyamata Brachyura; Annelida Polychaeta, and Osteichthyes. Organic material and plants were considered incidental.	1
Canal de Santa Cruz, PE, Brazil	-	-	The most common Osteichthyes Gerreidae <i>Eucinostomus</i> , and Crustacea Decapoda <i>Penaeus</i> .	2
Itaparica Island, Bahia, Brazil	39	5.1%	Crustacea Peracarida Amphipoda; Decapoda Dendrobranchiata, and Pleocyamata Brachyura; and Osteichthyes. Organic material and plants were considered incidental.	3
Itapeva and Quadros Lagoons, Rio Grande do Sul (RS), Brazil	150	-	Crustacea Copepoda, Cladocera, Amphipoda, Palaemonidae, Isopoda; Teleostei; Diptera; Arachnida; Annelida; and seed.	4
Tramandaí River, RS, Brazil	1250	75.8%	Generalist / Algae; Nematoda; Annelida Polychaeta; Mollusca Gastropoda, and Bivalvia; Insecta; Crustacea Copepoda Calanoida, Cirripedia Cladocera, Amphipoda, Mysidacea, Decapoda Anomura, Brachyura, and Macrura, Cumacea; Osteichthyes Mugilidae <i>Mugil</i> sp; and vegetables fragments.	5
Paraná, Uruguay and La Plata River	-	-	Osteichthyes, Crustacea Palaemonidae and Insecta.	6
Uruguay River, Rio Grande do Sul, Brazil	589	52%	Ichthyophagous / Insecta Coleoptera, Hymenoptera Formicidae, Odonata Coenagrionidae, Trichoptera Hydropsychidae, Diptera Chironomidae, Lepidoptera; Crustacea Cladocera Sididae, Calanoida Diaptomidae Notodiaptomus; Osteichthyes Characidae <i>Astyanax bimaculatus</i> , <i>A. fasciatus</i> , <i>Apareiodon affinis</i> , <i>Characidium pterostictum</i> , <i>Salminus brasiliensis</i> , <i>Oligosarcus brevioris</i> , <i>Odontostilbe piquira</i> , <i>Bryconamericus stramineus</i> , Curimatidae <i>Cyphocharax voga</i> , Engraulidae <i>Lycengraulis grossidens</i> ; sand, plants, seeds, eggs, gravels and, others invertebrates.	7
Bela Vista; Rosário; Mar del plata; Isla Trindade, Bahía Blanca; San Blas; Carmen de Patagones, rio Negro, Argentine	700	60%	Carnivorous / Freshwater: Crustacea <i>Palaemonetes argentinus</i> , Pseudodiaptomus, Acanthocyclops, Notodiaptomus, Isopodos, etc; Insecta Ephemeroptera, and Diptera; Osteichthyes Characidae <i>Astyanax</i> sp, Clupeidae <i>Rammogaster arcuata</i> , Pimelodidae <i>Luciopimelodus</i> sp, Atherinopsidae <i>Odontesthes bonariensis</i> . Salt water: Crustacea Brachyura, Copepode; Osteichthyes Clupeidae <i>R. arcuata</i> , and Engraulidae <i>Anchoa marmorata</i> .	8

seine data in the Patos Lagoon and adjacent coastal areas classified *L. grossidens* as semi-catadromous *sensu* Elliott et al. (2007).

The classification of *L. grossidens* as catadromous or semi-catadromous, by Weiss & Krug (1977), Weiss (1981) and Ramos (2005) at Patos Lagoon Estuary may be due to errors in the interpretation of the species abundance in the lagoon and the adjacent coastal area. Considering the information provided by Weiss (1981), where it is reported that: (i) the highest frequencies of eggs are recorded within the estuary at high salinities and, (ii) that the greatest abundance of eggs occur in waters of low salinity (<5), and (iii) that eggs were not captured in the channel of the estuary, it would be more parsimonious to think that the spawning of *L. grossidens* occurs in low salinity environments, where the highest abundances were recorded, and after that the eggs were washed to the sea, which would explain their increased frequency, but no increasing in abundance in waters of higher salinities. This interpretation is corroborated by the data provided by Sinque & Muelbert (1998) who found that the greatest abundance of eggs of *L. grossidens* occurs on the surface of low salinity water that flows to the ocean, even with salty water intruding below.

Other authors studying the Patos Lagoon system classified the species as estuarine resident (Vieira et al. 2010), marine migrant, sub-category marine estuarine dependent *sensu* Elliott et al. (2007) (Chao et al. 1985, Garcia et al. 2003) or even freshwater resident in

the limnic portion of the Patos Lagoon (Viamão), about 280 km from the sea (Lucena et al. 1994).

If we combine the data provided by Lucena et al. (1994) and information at the adjacent marine coast of Patos Lagoon (Cunha 1981), with the data analyzed by Ramos (2005) it is possible also to visualize an anadromous or semi-anadromous classification for *L. grossidens* in the Patos Lagoon. The species is absent in the sea during the winter (Cunha 1981), but occurs in the estuary and limnic portion of the Patos Lagoon (Ramos 2005). Adults are caught during the spring, both in the limnic and estuarine regions, which corresponds to the spawning period (September-January) (Ramos 2005).

The fact that the individual larger than the size of first maturation occurs year round in some parts of the La Plata River, the Patos Lagoon and Paranaguá Estuaries (Fuster de Plaza & Boschi, 1961, Lucena et al. 1994, Oliveira 2008, Vieira et al. 2010) could be attributable to part of the population that does not migrate. This would add a new hypothesis to the migratory behavior of the species: the existence of partial or facultative migration, where only part of the population adopts this migratory behavior as recently reported for other migratory species (Chapman et al. 2012).

5.1. Marine populations

There are records of *L. grossidens* fisheries between December and May along the Argentinean Coast (Fuster de Plaza & Boschi 1961). Along the coast of Uruguay, the species is abundant in marine

Table 3. Description of habitat use for *Lycengraulis grossidens* throughout its distribution according to the literature. The last column is a standardization of classification of estuarine-use functional groups following Elliott et al. (2007). References: 1 Krumme et al. (2004), 2 Vasconcelos-Filho & Oliveira (1999), 3 Reis-Filho et al. (2010), 4 Sánchez-Botero et al. (2008), 5 Vilar et al. (2011), 6 Costa & Souza-Conceição (2009), 7 Ramos (2005), 8 Lepkoski et al. (2005), 9 Chao et al. (1985), 10 Garcia et al. (2003), 11 Vieira et al. (2010), 12 Weiss et al. (1976), 13 Weiss (1981), 14 Mastrarrigo (1947) and, 15 Fuster de Plaza & Boschi, (1961). LAT/LONG = latitude/longitude.

Localities	LAT/LONG	Classification of habitat use proposed in the literature	Ref.	Standardization of classification of habitat use
Caeté Estuary, Brazil	0°/6° W	Marine migrant: utilize the estuary both as adults and juveniles, but spawn in the sea.	1	Marine migrant (MM)
Itamaracá, Brazil	7° S/34° W	Marine dependent: species found in estuary environment from juvenile to adult.	2	MM sub-category Marine estuarine dependent
Paraguaçu River Estuary, Brazil	12° S/38° W	Marine stragglers based on Elliott et al. (2007)	3	Marine straggler
Cabiúnas Lagoon, Brazil	22° S/41° W	Marine dependent: species spawn in the sea and use the coastal lagoons as a nursery for larvae and juveniles, or for adult permanence for long periods.	4	MM
Babitonga Bay, Brazil	26° S/48° W	Marine migrant: without explanation	5	MM
Babitonga Bay, Brazil	26° S/48° W	Estuarine resident: without explanation	6	Estuarine specie sub-category E. resident
Patos Lagoon and Tramandai Estuaries, RS, Brazil	29° S/49° W and 32° S/52° W	Estuarine-catadromous: species born in the estuary, migrate to fresh water to grow and return to the estuary to breed.	7	Semi-catadromous
Uruguai River, Brazil	30° S/57° W	Freshwater species. This category is not in Elliott et al. (2007)	8	-
Patos Lagoon Estuary, RS, Brazil	32° S/52° W	Estuarine dependent marine fishes: those marine coastal spawners that utilize the estuarine environment as a post larval and juvenile nursery during the first years of their life cycles.	9	MM sub-category Marine estuarine dependent
Patos Lagoon Estuary, RS, Brazil	32° S/52° W	Estuarine dependent: marine or freshwater spawning species found predictably in large numbers in estuaries during certain periods of their life-cycle.	10	MM sub-category Marine estuarine dependent
Patos Lagoon Estuary, RS, Brazil	32° S/52° W	Estuarine resident: the species is found in the estuary year-round, either as juvenile or adult.	11	Estuarine species sub-category E. resident
Patos Lagoon Estuary, RS, Brazil	32° S/52° W	Catadromous: eggs found in the estuary and the absence of eggs in the early stages of development lead the author to believe that the species spawns on the coast.	12-13	Catadromous
Paraná and Prata Rivers, Argentina	34° S/58° W	Anadromous: Individuals migrate from estuary or adjacent marine region and spawn in Uruguay or Paraná Rivers, returning to the marine environment.	14-15	Anadromous

beach seine samples (Retta et al. 2006). In southern Brazil (Cassino Beach, RS), juveniles and larvae of the species are regularly found from September to May, being more abundant during the summer (Cunha 1981, Busoli & Muelbert 2003). The continuous record of *L. grossidens* as bycatch of shrimp fisheries in Rio Grande do Sul, Santa Catarina and São Paulo States certifies the presence of this species in the coastal zone of southern Brazil (see "Fishery" item). Although the species is frequently caught as adults in the coastal zone, there is no record of spawning in the marine environment, suggesting that the species use the marine habitat as a temporary or transitory environment. In the northeast of Brazil (Jaguaribe Beach, state of Pernambuco - PE), adults of *L. grossidens* are abundant in the coastal zone for most of the year, but absent in July, August and September (Santana & Severi 2009).

5.2. Estuarine Populations

At La Plata River (AR), *L. grossidens* is frequent and abundant in the riverine portion of the estuary, near the estuarine area

(García et al. 2010). In the Patos Lagoon Estuary, the species occurs throughout the year (Buckup 1984, Chao et al. 1985, Ramos 2005, Vieira et al. 2010), and was among the ten most abundant species of shallow waters (Vieira et al. 2010), bottom trawl (Vieira 2006) and dominated the pelagic assemblage (Vieira & Castello 1997). At Patos Lagoon Estuary salinity appears to segregate different age cohorts of *L. grossidens*, with larvae preferring oligohaline waters for their development (Castello & Krug 1978), besides which the relative abundance of juveniles is higher in El Niño than La Niña years (García et al. 2001).

In the Paranaguá Estuary (state of Paraná, Brazil) the species also occurs throughout the year (Oliveira 2008) and is the fifth most abundant species in beach seine catches (Spach et al. 2004). *Lycengraulis grossidens* was the seventh most abundant species in the Saco da Fazenda's Estuary (Itajai – state of Santa Catarina, Brazil) (Barreiros et al. 2009). In Caeté Estuary (state of Pará, Brazil), the species has been recorded as the fourth and sixth most abundant in

number of larvae and adults, respectively (Barletta-Bergan et al. 2002, Krumme et al. 2004).

5.3. Freshwater Populations

Whilst there are some authors that pointed out that *L. grossidens* is able to migrate throughout the fishway systems in Salto Grande and Yacyreta reservoirs (Espinach Ros & Parodi 1997, Oldani et al. 2001, 2007), one landlocked population is described in the Uruguay River at more than 550 km from the sea, up to Salto Grande dam, where the species is captured year-round and has been able to reproduce (Lepkoski et al. 2005, Teixeira de Mello et al. 2011). There are also records of *L. grossidens* at least 1,500 km upstream the Paraná River, up to the Yacyreta dam (Benedito-Cecilio et al. 1997) and in the Amazonas River more than 1,300 km from the sea (Saint-Paul et al. 2000). Oliveira (1997) reported reproductive activity of the species in the Fortaleza Lagoon, RS, Brazil, which, during the study period, was fresh water and were isolated from the sea by a barrier. Reinforcing the idea that the species may remain in freshwater, *L. grossidens* has been reported year round at more than 300 km from the sea in the limnic portion of the Patos Lagoon (Lucena et al. 1994) and also in the Mirim Lagoon, RS, Brazil (Burns et al. 2006, Moura et al. 2012).

Final Conclusions and Future Research Directions

It is possible to identify some controversial information in the literature regarding habitat use, i.e. at least seven distinct classifications (marine migrant, marine stragglers, estuarine resident species, semi-catadromous, catadromous, anadromous and also freshwater habitant) have been proposed so far, and apparently *L. grossidens* has differences in its pattern of habitat use throughout its distribution, as suggested in the literature (see Table 3).

The patterns of habitat use seem to support a clinal use of the estuarine environment by *L. grossidens*. In lower latitudes *L. grossidens* has usually been described as marine migrant or marine straggler (Vasconcelos-Filho & Oliveira 1999, Krumme et al. 2004, Sánchez-Botero et al. 2008, Reis-Filho et al. 2010, Vilar et al. 2011), although spawning activities were never reported for lower or higher latitudes in the marine environment. In contrast, the species shows the proven ability to reproduce in both fresh water (Fuster de Plaza & Boschi 1961, Oliveira 1997, Lepkoski et al. 2005) and estuarine environments (Ramos 2005, Oliveira 2008). In higher latitudes, in Argentina, Uruguay and southern Brazil, the species seems to have a component with an anadromous or semi-anadromous behavior, i.e., some individuals spawn in fresh water or estuaries, migrating from marine or estuarine environment. Although other individuals of the same population seems to be resident in estuarine waters or even in fresh water (Fuster de Plaza & Boschi 1961, Lucena et al. 1994, Burns et al. 2006, Vieira et al. 2010). Thus, due to the number of possible patterns, the most parsimonious hypothesis is that this species has high plasticity in its habitat use for reproduction and that the species may be partial or facultative diadromous. Such intraspecific variation in migratory behavior is well known in different fish species and appears to be the rule rather than the exception (McDowall 2007, Chapman et al. 2012).

Although temperature could be considered as a factor to explain this latitudinal behavior, the magnitude of the estuarine systems along the western Atlantic Coast is also a good argument to explain the estuarine use. From the Amazon River (the largest river discharge in the world) to the south there are no significant freshwater discharges throughout the northeast and southeast Brazilian Coast. The freshwater influence starts to be important once more at Patos Lagoon and La Plata estuarine systems. The lack of saltwater spawning records and the increasing of estuarine related contingents

at south of the distribution, in addition to the well know reported landlocked freshwater population suggest that *L. grossidens* has a freshwater origin.

Despite of large advances have been achieved with the molecular phylogenetics studies, and the publications of tools for application in population genetics as primers to microsatellite amplification (Lavoué et al. 2010, Bloom & Lovejoy 2012, Mai et al. 2013), population genetic studies are needed in order to know the degree of connectivity and gene flow between populations, as evidenced by the morphological investigations carried out along the Brazilian Coast by Silva (2006).

Acknowledgments

We thank Alexandre M Garcia, Daniel Loebmann, José H Muelbert, Luis F Marins and Lumi Haraguchi for comments on a first draft of the manuscript. ACGM is supported by a doctoral fellowship (Grant no. 140740/2010-4) from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq). We thank the Brazilian Long Term Ecological Research (LTER or PELD) and SISBIOTA (CNPq and FAPERGS) for financial support.

References

- ALBUQUERQUE, P.G.A. 1994. Recursos potenciais de peixes da fauna acompanhante a pesca de camarões da foz do rio São Francisco, Litoral Norte, Piaçabuçu, AL. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BAIGÚN, C.R.M., SVERLIJ, S.B. & LÓPEZ, H.L. 2003. Recursos pesqueros y pesquerías del río de La Plata interior y medio (margen Argentina). Freplata PNUD/GEF/RLA799/G31. www.freplata.org/documentos (último acesso em 26/05/2012).
- BAIL, G.C. & BRANCO, J.O. 2003. Ocorrência, abundância e diversidade da ictiofauna na pesca do camarão sete-barbas, na região de Penha, SC. Notas Técn. Facimar 7:73-82.
- BARLETTA-BERGAN, A., BARLETTA, M. & SAINT-PAUL, U. 2002. Structure and seasonal dynamics of larval fish in the Caeté River Estuary in North Brazil. Estuar. Coast. Shelf S. 54:193-206. <http://dx.doi.org/10.1006/ecss.2001.0842>
- BARLETTA, M., JAUREGUIZAR, A.J., BAIGUN, C., FONTOURA, N.F., AGOSTINHO, A.A., ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L., TORRES, R.A., JIMENES-SEGURA, L.F., GIARRIZZO, T., FABRÉ, N.N., BATISTA, V.S., LASSO, C., TAPHORN, D.C., COSTA, M.F., CHAVES, P.T., VIEIRA, J.P. & CORRÊA, M.F.M. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. J. Fish Biol. 76:2118-2176. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02684.x>
- BARREIROS, J.P., BRANCO, J.O., FREITAS-JUNIOR, F.L., MACHADO, HOSTIM-SILVA, M. & VERANI, J.R. 2009. Space-time distribution of the ichthyofauna from saco da fazenda Estuary, Itajaí, Santa Catarina, Brazil. J. Coast. Res. 255:1114-1121. <http://dx.doi.org/10.2112/08-1050.1>
- BENEDITO-CECILIO, E., AGOSTINHO, A.A., JULIO, H.F. & PAVANELLI, C.S. 1997. Length-weight relationship of fishes caught in the Itaipu reservoir. Rev. Bras. Zool. 14(1):1-14.
- BERRA, T.M. 2007. Freshwater fish distribution. University of Chicago Press, Chicago. <http://dx.doi.org/10.7208/chicago/9780226044439.001.0001>
- BERVIAN, G. & FONTOURA, N.F. 1994. Dinâmica populacional da ictiofauna da lagoa Fortaleza, Cidreira, RS. III. *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Teleostei, Callichthyidae). Biociencias 2:15-23.
- BLOOM, D.D. & LOVEJOY, N.R. 2012. Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). J. Evol. Biol. 25:701-715. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02464.x>

- BORTOLUZZI T., ASCHENBRENNER, A.C., SILVEIRA, C.R., ROOS, D.C., LEPKOSKI, E.D., MARTINS, J.A., GOULART, M.G., QUEROL, E. & QUEROL, M.V. 2006. Hábito alimentar da sardinha prata, *Lycengraulis grossidens* (Spix and Agassiz, 1829), (Pisces, Engraulidae), Rio Uruguai médio, sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biodivers. Pampeana* 4:11-23.
- BRANCO, J.O. & VERANI, J.R. 2006. Análise quali-quantitativa da ictiofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas, na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina. *Rev. Bras. Zool.* 23(2):381-391. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000200011>
- BUCKUP, P.A. 1984. Distribuição e abundância de Engraulídeos (Osteichthyes, Clupeiformes) na região estuarial da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- BURNS, M.D.M., GARCIA, A.M., VIEIRA, J.P., BEMVENUTI, M.A., MARQUES, D.M.L. & CONDINI, M.V. 2006. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 4(1):69-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252006000100006>
- BUSOLI, R.O. & MUELBERT, J.H. 2003. Environmental factors and ichthyoplankton dynamics in the surf zone of Cassino sandy beach (32°10'S, 52°20'W). *J. Coast. Res.* 35:463-471.
- CARVALHO-FILHO, A. 1999. Peixes: costa brasileira. Editora Melro, São Paulo.
- CASTELLO, J.P. & KRUG, L.C. 1978. Distribution, growth and spawning groups of the manjuba (*Lycengraulis grossidens*) in the estuary of the Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brazil. *Atlântica* 3:33-46.
- CASTELLO, J.P. 1985. The ecology of consumers from dos Patos Lagoon estuary, Brazil. In *Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration* (A. Yanez-Arancibia, ed.). DR(R) UNAM Press, Mexico, p.383-406.
- CERVIGÓN, F. 2005. La ictiofauna marina de Venezuela: una aproximación ecológica. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela* 44(1):3-28.
- CHAO, L.H., PEREIRA, L.E. & VIEIRA, J.P. 1985. Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study. In *Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration* (A. Yanez-Arancibia, ed.). DR(R) UNAM Press, Mexico, p.429-450.
- CHAPMAN, B.B., SKOV, C., HULTHÉN, K., BRØDENSEN, J., NILSSON, P.A., HANSSON, L.A. & BRÖNMARK, C. 2012. Partial migration in fishes: definitions, methodologies and taxonomic distribution. *J. Fish Biol.* 81(2):479-499. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03349.x>
- COSTA, M.D.P. & SOUZA-CONCEIÇÃO, J.M. 2009. Composição e abundância de ovos e larvas de peixes na baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. *PanamJAS* 4(3):372-382.
- CUNHA, L.P.R. 1981. Variação sazonal da distribuição, abundância e diversidade dos peixes na zona de arrebentação da praia do Cassino, R. S. - Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- DUMONT, L.F.C. & D'INCAO, F. 2011. By-catch analysis of Argentinean prawn *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeidae) in surrounding area of Patos Lagoon, southern Brazil: effects of different rainfall. *JMBA* 91(5):1059-1072.
- ELLIOTT, M., WHITFIELD, A.K., POTTER, I.C., BLABER, S.J.M., CYRUS, D.P., NORDLIE, F.G. & HARRISON, T.D. 2007. The guild approach to categorizing estuarine fish assemblages: a global review. *Fish Fish.* 8:241-268. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2679.2007.00253.x>
- ESKINAZI, A.M. 1972. Peixes do Canal de Santa Cruz, Pernambuco, Brasil. *Trab. Ocean. UFPE* 13:283-302.
- ESPINACH ROS, A. & PARODI, C.R. 1997. Conservación de la fauna ictica en el embalse de Salto Grande. Publicación de la comisión administradora del Río Uruguay y la comisión técnica mixta de Salto Grande, Montevideo.
- EVERMANN, B.W. & KENDALL, W.C. 1906. Notes on a collection of fishes from Argentina, South America, with descriptions of three new species. *Proc. US Nat. Mus.* 31:67-108. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00963801.31-1482.67>
- FROESE, R. & PAULY, D. 2011. FishBase. www.fishbase.org.
- FUSTER DE PLAZA, M.L. & BOSCHI, E.E. 1961. Areas de migración y ecología de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en las aguas argentinas (Pisces, fam. Engraulidae). *Fac. Cien. Exactas Naturales* 1(3):127-183.
- GARCIA, A.M., VIEIRA, J.P. & WINEMILLER, K.O. 2001. Dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon estuary (Brazil) during cold and warm ENSO episodes. *J. Fish Biol.* 59:1218-1238. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00187.x>
- GARCIA, A.M., VIEIRA, J.P. & WINEMILLER, K.O. 2003. Effects of 1997–1998 El Niño on the dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon Estuary (Brazil). *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 57(2003):489-500. [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7714\(02\)00382-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00382-7)
- GARCIA, M.L., JAUREGUIZAR, A.J. & PROTOGINO, L.C. 2010. From fresh water to the slope: fish community ecology in the Río de la Plata and the sea beyond. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38(1):81-94. *ry* (Brazil). *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 57(2003):489-500. <http://dx.doi.org/10.3856/vol38-issue1-fulltext-8>
- GOULART, M.G., ASCHENBRENNER, A.D.C., BORTOLUZZI, T., SILVEIRA, C.D.R.D., LEPKOSKI, E.D., MARTINS, J.A., BRANDLI, E.D.S., ROOS, D.C., QUEROL, E. & QUEROL, M.V. 2007. Análise do crescimento de escamas de *Lycengraulis grossidens* (AGASSIZ, 1829), em populações da bacia do Rio Uruguai médio, Rio Grande do Sul. *Biodivers. Pampeana* 5(1):3-8.
- GRANDE, L. & NELSON, G.J. 1985. Interrelationships of fossil and recent anchovies (Teleostei: Engrauloidea) and description of a new species from the Miocene of Cyprus. *Am. Mus. Novit.* 2826:1-16.
- GUEDES, D.S., VASCONCELOS-FILHO, A.L. & MACEDO, R.M. 2005. Ictiofauna do infralitoral adjacente às margens do Canal de Santa Cruz - Itapissuma, Pernambuco. *Bol. Técn. Cient. CEPENE* 13(2):65-75.
- HAIMOVICI, M. & MENDONÇA, J.T. 1996. Descartes da fauna acompanhante na pesca de arrasto e tangones dirigida a linguados e camarões na plataforma continental do sul do Brasil. *Atlântida* 18:161-177.
- HILDEBRAND, S.F. 1943. A review of the american anchovies (Family Engraulidae). *Bull. Bing. Ocean Collec.* 8:1-165.
- JORDAN, D.S. & SEALE, A. 1926. Review of the Engraulidae, with descriptions of new and rare species. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 67: 355-418.
- JOYEUX J.-C., PEREIRA, B.B. & ALMEIDA, H.G. 2004. The flood-tide ichthyoplankton community at the entrance into a Brazilian tropical estuary. *J. Plankton Resour.* 26(11):1277-1287. <http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbh119>
- KRUMME, U., SAINT-PAUL, U. & ROSENTHAL, H. 2004. Tidal and diel changes in the structure of a nekton assemblage in small intertidal mangrove creeks in northern Brazil. *Aquat. Living Resour.* 17:215-229. <http://dx.doi.org/10.1051/alr:2004019>
- KULLENDER, S.O. & FERRARIS, C.J. 2003. Family Engraulidae. In *Check list of freshwater fishes of South and Central America* (R.E. Reis, S.O. Kullender & C.J. Ferraris, eds.). Edipucers, Porto Alegre, p.39-45.
- LAVOUÉ, S., MIYA, M. & NISHIDA, M. 2010. Mitochondrial phylogenomics of anchovies (family Engraulidae) and recurrent origins of pronounced miniaturization in the order Clupeiformes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56:480-485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.022>
- LEMOS, P.H.B., CORRÊA, M.F.M. & PINHEIRO, P.C. 1995. Catálogo de otólitos de Engraulidae (Clupeiformes-Osteichthyes) do litoral do Paraná, Brasil. *Arq. Biol. Tecnol.* 38(3):731-745.

- LEPKOSKI, E.D., QUEROL, E., ASCHENBRENNER, A.C., BORTOLUZZI, T.P., MARTINS, J.A., ROOS, D.C., SILVEIRA, C.R., GOULART, M.G. & QUEROL, M.V.M. 2005. Biologia reprodutiva da sardinha prata *Lycengraulis grossidens* (Spix and Agassiz, 1829) na bacia do rio Uruguai médio, localidade de são marcos município de Uruguiana região da fronteira oeste do estado do Rio Grande do Sul. In VII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, p.1-2.
- LIRA, A.K.F. & TEIXEIRA, S.F. 2008. Ictiofauna da praia de Jaguaribe, Itamaracá, Pernambuco. Iheringia 98(4):475-480. <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212008000400010>
- LOEBMANN, D. & VIEIRA, J.P. 2006. O impacto da pesca do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante) (Decapoda, Penaeidae) nas assembleias de peixes e siris do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Zool. 23(4):1016-1028. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400006>
- LOEBMANN, D., VIEIRA, J.P., BEMVENUTI, M.A., ASTARLOA, J.M.D., COUSSEAU, M.B. & FIGUEROA, D. 2008. Composition and relative abundance of fish species in two Coastal Lagoons in Austral South America: Peixe Lagoon (31°S; 51°W), Brazil, and Mar Chiquita Lagoon (37°S; 57°W), Argentina. Neotrop. Biol. Conserv. 3(1):28-33.
- LOPES, P.R.D. 1998. Nota sobre a alimentação de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Clupeiforme, Engraulidae) na praia de Jaguaribe (Ilha de Itamaracá), Pernambuco. Acta Biol. Leopoldensia 20(2):243-249.
- LOPES, P.R.D. & RESENDE, G. 2000. Nota sobre a alimentação de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Engraulidae) na praia de ponta da ilha (Ilha de Itaparica, Bahia). Acta Biol. Leopoldensia 22(1):129-132.
- LUCENA, C.A.S., JARDIM, A.S. & VIDAL, E.S. 1994. Ocorrência, distribuição e abundância de peixes na praia de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. 7:3-27.
- MAI, A.C.G., SILVA, T.F.A. & LEGAT, J.F.A. 2012. Assessment of the fish-weir fishery off the coast of Piauí State, Brazil. Arq. Ciênc. Mar. 45(2):40-48.
- MAI, A.C.G., VIEIRA, J.P., PLAVAN, A.A., NOBREGA, M.F., MORAES, L.E., RODRIGUES, F.L. & MARINS, L.F. 2013. Isolation and characterization of 18 microsatellites for *Lycengraulis grossidens* (Pisces: Clupeiformes). Conserv. Genet. Resour. 5:15-18. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-012-9718-2>
- MARQUES, W.M. 1997. Estimativa da rejeição da pesca do camarão-rosa *Penaeus paulensis* com aviãozinho no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- MASTRARRIGO, V. 1947. La sardinha de la cuenca del Río de la Plata (*Lycengraulis olidus*) (Günther). Ministerio de Agricultura, Montevideo.
- McDOWALL, R.M. 2007. On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. Fish Fish. 8:1-13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2979.2007.00232.x>
- MENEZES, R.S. 1950. Alimentação do peixe-cachorro, *Lycengraulis barboursi* Hildebrand, 1943, da bacia do Rio Parnaíba, Piauí (Actinopterygii, Engraulidae). Rev. Brasil. Biol. 10(3):285-293.
- MILANI, P.C.C. & FONTOURA, N.F. 2007. Diagnóstico da pesca artesanal na lagoa do casamento, sistema nordeste da laguna dos patos: uma proposta de manejo. Biociências 15(1):82-125.
- MOURA, P.M., VIEIRA, J.P., GARCIA, A.M. 2012. Fish abundance and species richness across an estuarine-freshwater ecosystem in the Neotropics. Hydrobiologia 696:107-122. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-012-1187-9>
- NIZINSKI, M.S. & T.A. MUNROE. 2002. Order Clupeiformes, Engraulidae. In The living marine resources of the Western Central Atlantic (K.E. Carpenter, ed.). Fao, Roma, p.764-794.
- OLDANI, N., BAIGÚN, C., DELFINO, R. & RODRIGUEZ, R. 2001. Evaluación de los sistemas de transferencia para peces de la represa de Yacyretá. Natura Neotropicalis 32(2):87-101.
- OLDANI, N., BAIGÚN, C., NESTLER, J.M. & GOODWIN, R.A. 2007. Is fish passage technology saving fish resources in the lower La Plata River basin? Neotrop. Ichthyol. 5(2):89-102. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252007000200002>
- OLIVEIRA, A. 1997. Dinâmica populacional de *Lycengraulis grossidens*, Agassiz 1829 nas lagoas Itaperava e quadros, subsistema Norte de lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil (Teleostei, Engraulidae). Dissertação, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre.
- OLIVEIRA, E.C. 2008. Ictiofauna da face norte da ilha rasa da cotinga, Baía de Paranaguá, Paraná: composição, estrutura da assembleia e reprodução. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- QUEIROZ, G.M.N., SPACH, H.L., SOBOLEWSKI-MORELOS, M., SANTOS, L.O. & SCHWARZ-JUNIOR, R. 2006. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. Biociências 14(2):112-124.
- RAMOS, L.A. 2005. Auto-ecologia de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Clupeiformes, Engraulidae) em estuários do Rio Grande do Sul e sua pesca na barra do rio Tramandaí, RS, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Rio Grande.
- REIS-FILHO, J.A., NUNES, J.A.C.C. & FERREIRA, A. 2010. Estuarine ichthyofauna of the Paraguaçu River, Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. Biota Neotrop. 10(4):301-311. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000400034>
- RETTA, S., MARTÍNEZ, G. & ERREA, A. 2006. Áreas de cria de peces en la costa Uruguaya. In Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya (R. Menafra, L. Rodríguez-Gallego, F. Scarabino & D. Conde, eds). Graphis, Montevideo, p.211-218.
- SAAD, A.M., BEAUMORD, A.C. & CARAMASCHI, E.P. 2002. Effects of artificial canal openings on fish community structure of Imboassica coastal lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. J. Coast. Res. 36:634-639.
- SAINT-PAUL, U., ZUANON, J., CORREA, M.A.V., GARCÍA, M., FABRÉ, N.N., BERGER, U. & JUNK, W.J. 2000. Fish communities in central Amazonian white- and blackwater floodplains. Envir. Biol. Fish. 57: 235-250. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007699130333>
- SÁNCHEZ-BOTERO, J.I., CARAMASCHI, E.P. & GARCEZ, D.S. 2008. Spatiotemporal variation in fish assemblage in a coastal lagoon without direct contact with the sea (Southeastern Brazil). J. Coast. Res. 24(4C):225-238. <http://dx.doi.org/10.2112/06-0752.1>
- SANTANA, F.M.S. & SEVERI, W. 2009. Composição e estrutura da assembleia de peixes da zona de arrebitação da praia de Jaguaribe, Itamaracá (PE). Bioikos 23(1):3-17.
- SANTOS, M.C.F., FREITAS, A.E.T.S. & SILVA, M.M. 1998. Composição da ictiofauna acompanhante da pesca de camarão em Tamandaré/PE e Pontal do Peba/AL. Bol. Técn. Cient. CEPENE 6(1):1-18.
- SANTOS, M.C.F., ALMEIDA, L. & SILVA, C.G.M. 2008. Avaliação qualitativa da ictiofauna acompanhante na pesca do camarão setebas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) no município de Caravelas (Bahia - Brasil). Bol. Técn. Cient. CEPENE 16(1):99-107.
- SCHULTZ, L.P. 1949. A further contribution to the ichthyology of Venezuela. Proc. US Nat. Mus. 99:1-211. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00963801.99-3235.1>
- SILVA, M.A. 2006. Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) ao longo da costa brasileira. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SINQUE, C. & MUELBERT, J.H. 1998. Ictioplankton. In Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil (U. Seeliger, C. Odebrecht & J.P. Castello, eds). Ecoscientia, Rio Grande, p.56-59.
- SPACH, H.L., GODEFROID, R.S., SANTOS, C., SCHWARZ-JUNIOR, R. & QUEIROZ, G.M.L. 2004. Temporal variation in fish assemblage composition on a tidal flat. Braz. J. Ocean. 52(1):47-58.
- SPINETTI, M., FOTI, R., RIESTRA, G. & FERNÁNDEZ, A. 2002. La actividad pesquera artesanal en el Río de la Plata: estructura y situación socioeconómica. In The Río de la Plata. Research for the management of the environment, the fisheries resources and fishery in the saline front (D. Vizziano, P. Puig, C. Mesones & G.J. Nagy, eds). UNESCO-ECOPATA, Montevideo, p.235-272.

- TEIXEIRA DE MELLO, F., GONZÁLEZ-BERGONZONI, I. & LOUREIRO, M. 2011. Pece de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP, Montevideo.
- VASCONCELOS-FILHO, A.L. & OLIVEIRA, A.M.E. 1999. Composição e ecologia da ictiofauna do Canal de Santa Cruz (Itamaracá – PE, Brasil). Trab. Oceanogr. UFPE 27(1):101-113.
- VALDEZ, J. & AGUILERA, O. 1987. Los peces del Golfo de Venezuela. Fondo editorial, Caracas.
- VIANNA, M. & D'INCAO, F. 2006. Evaluation of by-catch reduction devices for use in the artisanal pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) fishery in Patos Lagoon, Brazil. Fish. Res. 81:331-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2006.06.011>
- VIEIRA, J.P., VASCONCELOS, M.C., SILVA, R.E. & FISHER L. 1996. A rejeição do camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Atlântica 18(1):123-142.
- VIEIRA, J.P. & CASTELLO, J.P. 1997. Fish Fauna. In Subtropical Convergence Environments. The coast and sea in the Southwestern Atlantic. Subtropical Convergence Environments (U. Seeliger, C. Odebrecht & J.P. Castello, eds.). Springer-Verlag, New York, p.56-61.
- VIEIRA, J.P. 2006. Ecological analogies between estuarine bottom trawl fish assemblages from Patos Lagoon (32S), Brazil, and York River (37N), USA. Rev. Brasil. Zool. 23(1):234-247.
- VIEIRA, J.P., GARCIA, A.M. & MORAES, L. 2010. A assembléia de peixes. In Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil (U. Seeliger, C. Odebrecht & J.P. Castello, eds). Ecoscientia, Rio Grande, p.77-88.
- VILAR, C.C., SPACH, H.L. & JOYEUX, J.C. 2011. Spatial and temporal changes in the fish assemblage of a subtropical estuary in Brazil: environmental effects. JMBA 91(3):635-648.
- WEISS, G. 1981. Ictioplancton del estuario de Lagoa dos Patos, Brasil. Theses, Universidad Nacional De La Plata, Buenos Aires.
- WEISS, G., SOUZA, J.A.F. & SANTOS, A. 1976. Contribuição ao conhecimento do Ictioplancton marinho de plataforma sul do Brasil. Atlântica 1(1):1-99.
- WEISS, G. & KRUG, L.C. 1977. Características do desenvolvimento e metamorfose de *Lycengraulis olidus* (Engraulididae) e *Brevoortia pectinata* (Clupeidae) no estuário da lagoa dos Patos, Brasil. Atlântica 2(1):83-117.
- WHITEHEAD, P.J.P., NELSON, G.J. & WONGRATANA, T. 1988. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. FAO Fish Synopsis, Rome.

Received 02/18/2013

Revised 06/27/2013

Accepted 08/28/2013

Anexo II

High plasticity in habitat use of

***Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulididae)**

Ana C. G. Mai • Mário V. Condini • Cristiano Q. Albuquerque • Daniel
Loebmann • Tatiana D. Saint'Pierre • N. Miekeley • João P. Vieira

Submetido: Estuarine Coastal and Shelf Science

High plasticity in habitat use of *Lycengraulis grossidens*
(Clupeiformes, Engraulididae)

Mai, A. C. G., Condini, M. V., Albuquerque, C. Q., Loebmann, D.,
Saint'Pierre, T. D., Miekeley, N., Vieira, J. P. High plasticity in habitat use of
Lycengraulis grossidens (Clupeiforme, Engraulididae). Submetido a Estuarine, Coastal
and Shelf Science em 01/10/2013

Abstract

In this study, we analyzed the Sr:Ca and Ba:Ca ratios of the otoliths of 139 *Lycengraulis grossidens* individuals sampled along the southwestern Atlantic Ocean, including two freshwater areas, to describe patterns of habitat use and their latitudinal organization. Otolith sections were analyzed by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry along core-to-edge transects. Otolith edge analysis revealed significant differences in Sr:Ca and Ba:Ca ratios between fish from freshwater habitats and those from estuarine/marine habitats, indicating that these ratios may be used to describe habitat use patterns. Lifetime transects of Sr:Ca and Ba:Ca indicate at least four distinct habitat use patterns: freshwater residents, estuarine/marine residents, and two distinct diadromous/nomadic types. Most individuals (88.6%) sampled at northern latitudes in sheltered marine bays and the coastal ocean were marine/estuarine residents, whereas at southern latitudes, most individuals were diadromous (72.5%). We also identified landlocked populations in the Uruguay River and in Mirim Lagoon. These results suggest that *L. grossidens* exhibits flexible habitat use strategies and may use freshwater, estuarine and marine environments throughout their lifetime.

Keywords: otolith chemistry, elemental fingerprint, laser ablation ICP-MS, diadromous, partial migration, landlocked population.

Introduction

Intraspecific variation in migratory behavior of fishes has increasingly been documented worldwide (Secor, 2010). There is a variety of behaviors that may be related to the ability of fish to survive in alternative habitats as compelled by reproduction, feeding, searching for refuge against predators, avoidance of intraspecific competition and may also give increased resilience for the population as a whole in the face of environmental perturbations (see Kerr et al., 2010; Chapman et al., 2011a, 2012).

The term “partial migration” was recently proposed to describe the migratory behavior in which some fish within a population remain at their natal area while others migrate (Secor, 2010). Many species that were once regarded as classical migrants, such as trout *Salmo trutta* (anadromous), eels *Anguilla spp.* (catadromous) and mullets *Mugil cephalus* (catadromous), may currently be classified as partial migrants (Bohlin et al., 2001; Daverat et al., 2006; Wang et al., 2010). As the number of studies of fish migration increases, it appears that partial migrations may be the rule rather than the exception for many migratory fish species (Chapman et al., 2011a). In addition, intraspecific variation in the migratory behavior of many species previously recognized as diadromous (i.e., they move between salt- and freshwater habitats) has been increasingly reported in recent years (Limburg et al., 2001a,b; Daverat et al., 2011; Magath et al., 2013; Tulp et al., 2013).

As both migratory and non-migratory individuals may be found in the same population, the concept of migratory species is changing from the more restricted idea of obligatory movements across large distances (Myers, 1949; McDowall, 2001) towards a more flexible concept that includes the full gradient of behaviors from full residency to full migration.

One interesting example of the huge conceptual confusion surrounding migratory characterization is illustrated by the engraulid *Lycengraulis grossidens*. This fish is

widely distributed in the Atlantic Ocean from Belize to Argentina (Whitehead et al., 1988). It has been considered a marine fish (Bloom and Lovejoy, 2012) despite being one of the most abundant fish in estuaries of the southwestern Atlantic Coast and its occurrence in freshwater habitats (Barletta et al., 2010; Mai and Vieira, 2013). The patterns of habitat use and migration of *L. grossidens* remain unclear. For example, this species has been classified as anadromous (Mastrarrigo, 1947; Fuster de Plaza and Boschi, 1961), catadromous (Weiss et al., 1976), estuarine dependent (Chao et al., 1985), marine migrant (Krumme et al., 2004), estuarine resident (Vieira et al. 2010) and marine straggler (Reis-Filho et al., 2010). All of these classifications are based on patterns of fish abundance and reproduction across different habitats. In a recent review, Mai and Vieira (2013) recognized the intraspecific variation in the migratory behavior of *L. grossidens* and suggested that new inference tools are needed to understand their migratory patterns and movements along the southwestern Atlantic Ocean.

Fish movements have been studied using a variety of tools, such as mark and recapture, telemetry, and the analysis of trace elements in otoliths (Casselman, 1982); the latter has been widely used in recent years. Otoliths function as natural tags because some trace elements are incorporated in the substitution to Ca^{2+} into the otolith carbonatic matrix (Campana, 1999) in proportion to the element-to-Ca availability in the water. Strontium and barium are among the most studied otolith constituents and are expected to indicate the movements of a fish over its lifespan across a salinity gradient (Campana, 1999). While Sr:Ca ratios in the water usually increase with the transition from fresh water to marine waters, Ba:Ca ratios generally present the inverse pattern (Elsdon et al., 2008). These water chemical characteristics will subsequently be stored in the otoliths under a temporal organization. Otolith chemistry analysis presents advantages over other methods (e.g., mark and recapture, satellite transmitters), as each fish in a population is naturally-marked, with their otoliths

potentially providing information over its lifetime (Campana, 1999; Elsdon and Gillanders, 2006; Secor, 2010).

In the present study, we asked two main questions: (1) As *L. grossidens* occurs in fresh, estuarine and marine waters year-round and is frequently classified as migrant, does this species exhibit partial migratory behavior? (2) If so, is there a latitudinal organization of its migratory patterns along the southwestern Atlantic Ocean? We investigated these questions based on an intensive otolith chemistry dataset of *L. grossidens* collected over a broad latitudinal scale.

Materials and methods

Individual *L. grossidens* (n=139) were obtained from coastal and freshwater habitats of eastern South America from 7 to 36° S between 2010 and 2011 (Fig. 1). Environmental characteristics of each sampling site are described briefly in Table I. All sampled specimens were measured for total length and weighed, and sagittal otoliths were extracted, cleaned and stored dry. The left otoliths were embedded in crystal polyester resin, and transverse sections were cut through the core using a low-speed, diamond-blade Isomet saw. Thin sections (0.4 mm) were mounted onto glass slides with cyanoacrylic glue. Prior to laser ablation inductively coupled plasma spectrometry analysis, otolith surfaces were polished with silicon carbide paper (n° 8000), washed with ultrapure DI water (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA), sonicated for 3 minutes, and rinsed three times with ultrapure water. The slides were then dried in a laminar flow cabinet before analysis.

Elemental analysis

Otolith transects were ablated from the core to the edge to encompass the entire fish life-history. Analytical measurements were performed with a Q-switched pulsed 266 nm Nd:YAG laser (LSX 100, CETAC Technologies Inc., Omaha, NE, USA) coupled to an ELAN 6000 inductively coupled plasma mass spectrometer (PerkinElmer–SCIEX, Waltham, MA, USA). The laser was operated at a pulse

frequency of 20 Hz, a scan speed of 40 $\mu\text{m/s}$, and an energy output of 0.4–0.6 mJ per pulse. Under these conditions, the crater width was approximately 25 μm . The ablated material was conducted through a Teflon coated tube into the ICP-MS using Argon as a carrier gas ($0.85 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$). The ICP was operated at 1500 W RF power, with an outer and intermediate gas flow of 15 and $1.1 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, respectively. The elements were determined measuring the following isotopes (m/z): ^{43}Ca , ^{86}Sr and ^{138}Ba . After every tenth otolith ablation, the background intensity was measured for fifty seconds. Strontium and calcium counts per second (cps) were subtracted from the background level, and element:Ca ratios were then calculated for all otoliths. The ICP-MS had been previously optimized through the *Daily Performance*, with maximum analyte intensities and minimum interferences determined using oxides and double charged ions. Repeatability was estimated as the relative standard deviation (RSD) from 10 consecutive measurements of the standard NIST 1834, resulting in relative standard deviations of 12.43, 6.91 and 3.99% for ^{138}Ba , ^{86}Sr and ^{43}Ca , respectively, which is considered acceptable.

Data analysis and model description

After chemical analysis, otolith sections were examined under a dissecting microscope to determine annuli position and therefore the specific ages along the lasered tracks. It was not possible to visualize the annual growth increments in the otoliths of fish sampled at the warmer sites (Mampituba, Ribeira Estuaries, Todos os Santos Bay and Pau Amarelo Beach).

To characterize habitat use and migratory patterns, two basic steps were conducted. The first established the proximate chemical signature of otoliths from freshwater, estuarine and marine fish. These chemical signatures were inferred by averaging the Sr:Ca and Ba:Ca profiles at the region corresponding to the otolith edge, as it contains the most recently deposited material. To be coherent, these mean signatures should exhibit increasing Sr:Ca, and decreasing Ba:Ca, ratios over the

transition from freshwater to marine habitats, indicating that otolith chemistry can be used as a habitat proxy for *L. grossidens*. The mean Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the otolith edges were then compared between paired sites via the Kruskal-Wallis test, as the data did not follow a normal distribution. To evaluate whether otolith composition was significantly influenced by fish size, the mean Sr:Ca and Ba:Ca ratios at the otolith edge were regressed against fish size for all the samples.

The second step assigned individual fish to a specific pattern of habitat use and migratory patterns based on the patterns of Sr:Ca and Ba:Ca fluctuation along the otolith lifetime profiles. We recognized at least four general habitat use patterns. Freshwater residency was assigned when low Sr:Ca and high Ba:Ca ratios remained approximately constant for the entire lifetime profile, with only minor variation. Diadromous/nomadic was assigned when changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios over the otolith lifetime profiles were apparent. This category was further separated into two contingents: diadromous/nomadic type A, encompassing individuals that occupied fresh water habitats during the early life stages and then moved to the sea, either remaining there or returning to fresh water; and diadromous/nomadic type B, encompassing individuals that used estuarine or marine habitats during their early life stages but occupied fresh water at least once during their life span. Finally, estuarine/marine residency was assigned when high Sr:Ca and low Ba:Ca ratios were observed across the lifetime profiles. The most representative profiles of each habitat use pattern are represented graphically, allowing the reader to distinguish between them.

We recognize that the identification of these patterns is subjective. Therefore, to evaluate the reliability of this classification, we conducted a discriminant analysis, with the average Sr:Ca and Ba:Ca lifetime profiles and respective standard deviations as dependent variables and the four habitat use patterns as grouping variables. Observed and predicted classifications were then compared to evaluate the percentage of correct classifications. This analysis was conducted using StatSoft (2007). The percentages of

habitat use patterns in each sampling site were then analyzed along the latitudinal gradient.

Results

The 139 sampled fish ranged from 70 to 290 mm in total length (Tab. I). No significant correlations were detected between the element ratios in the otolith edges and fish size ($r^2=0.0092$ for Sr:Ca; $r^2=0.0004$ for Ba:Ca, $p>0.05$ for both). When considering the Sr:Ca and Ba:Ca ratios for the entire lifetime profiles, both elements varied significantly between fish sampled from freshwater and those sampled from estuarine/marine habitats. The most important variable discriminating habitat use patterns was Sr:Ca ($F=51.74$, $p<0.001$, Table II).

The analysis of Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the otolith edges (representative of recent deposition) among sampling locations allowed to distinguish between freshwater and estuarine/marine individuals; however, it did not permit discrimination between individuals within freshwater habitats (Mirim Lagoon and Uruguay River, Fig. 2, Tab. S1). The mean Sr:Ca ratios in the otolith edges ranged from 0.082 ± 0.048 for fresh water (Mirim Lagoon) to 0.291 ± 0.118 for marine water (Pau Amarelo Beach), whereas the mean Ba:Ca ratios varied from 0.026 ± 0.019 (Mirim Lagoon) to 0.002 ± 0.001 (Pau Amarelo Beach) (Fig. 2, Tab S1).

Fish from estuaries of the southern sampled region (Patos Lagoon and La Plata) showed higher Ba:Ca ratios relative to those of the northern estuaries (Mampituba and Ribeira, Fig. 2, Tab S1). Strontium:Ca ratios of otoliths from La Plata, Patos Lagoon and Mampituba Estuaries did not differ from those of Cassino Beach ($p>0.05$). In contrast, otolith Ba:Ca ratios were significantly higher at Cassino Beach and the Patos Lagoon Estuary than at the La Plata and Mampituba Estuaries (all $p<0.001$). Mampituba Estuary, Ribeira Estuary and Todos os Santos Bay showed no significant differences in the mean Ba:Ca ratios in otolith edges ($p>0.05$) (Fig. 2, Tab. S1).

The lifetime patterns of Sr:Ca and Ba:Ca ratios in otoliths show four distinct habitat use patterns (Fig. 3 and 4). Discriminant analysis correctly assigned 85% of the diadromous fish, 87% of the freshwater residents and 90% of the estuarine/marine residents (Tab. III), indicating that the adopted classification is reliable.

The proportion of different contingents varied among sampling sites, with marked latitudinal variation (Fig. 1, Tab. S2). Fish sampled at low latitudes at sheltered marine bays and coastal oceans were primarily estuarine/marine resident (or salt-water related resident). For example, in Ribeira Estuary and Todos os Santos Bay, 79% and 100%, respectively, of all *L. grossidens* analyzed were estuarine/marine residents. In contrast, fish from high latitudes (i.e., the southern sampling areas) were primarily diadromous. For example, 74% and 78% of all fish sampled at La Plata Estuary and Cassino Beach, respectively, were diadromous type A (fish with freshwater early life stages). In general, diadromous/nomadic type A fish were more abundant than diadromous/nomadic type B fish (i.e., individuals occupying estuarine or marine habitat during early life stages, Fig. 1, Tab. S2).

As expected, almost all samples of fish from the freshwater locations (Mirim Lagoon and Uruguay River) had otolith signatures representative of freshwater residents, therefore evidencing possible landlocked populations. Except by 8 out of 14 fish from Mirim Lagoon that presented Sr:Ca and Ba:Ca ratios that varied from salt to freshwater in the pattern characteristic of diadromous/nomadic type A individuals.

Discussion

The analysis of strontium and barium in the otoliths of *L. grossidens* clearly differentiated fish from fresh water habitats from those of estuarine/marine habitats. Both the Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the otoliths exhibited expected patterns, with low Sr:Ca and high Ba:Ca ratios found in fish from fresh water and the inverse pattern found for fish from estuarine/marine waters. Although our data indicate that fish from estuarine waters presented lower Sr:Ca and higher Ba:Ca ratios relative to fish from

marine habitats, the observed differences were not great enough to allow us to separate them statistically. These results were already expected as the greatest changes in Sr and Ba uptake into otoliths occur in low salinity waters, with Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the water show the largest rate of change below 5 (Macdonald and Crook, 2010). In addition, other factors may have contributed to our inability to discriminate between marine and estuarine fish. First, the amount of fresh water runoff in the southern parts of Brazil, Uruguay and northern Argentina is large and extremely variable (Piola et al., 2008) and therefore could mask the true estuarine or marine chemical signatures in the analyzed otoliths. Second, we cannot be certain that a collected fish at a particular estuary resided there long enough to incorporate a full estuarine chemical signature into its otoliths. Therefore, we have no other option than grouping estuarine and marine habitats into a single category.

The positive relationship observed between water salinity and *L. grossidens* otolith Sr:Ca ratios is consistent with that observed in other species in the Southwestern Atlantic (Albuquerque et al., 2010, 2012), as well as in other Engraulididae species worldwide (Secor and Rooker, 2000; Yang et al., 2006; Morais et al., 2010; Jiang et al., 2012). Barium:Ca ratios in otoliths have also been inversely related to water salinity in other species (Secor et al., 2001; de Vries et al., 2005; Albuquerque et al., 2010). These findings support the use of otolith Sr and Ba ratios in *L. grossidens* as habitat indicators along the coastal Southwestern Atlantic Ocean.

Patterns of habitat use and terminology

Large phenotypic plasticity in habitat use has been reported among fishes, and the terminology to describe it has not kept pace with new behavioral descriptions (Secor, 2010). Fish movement between salt and freshwater habitats is inherent to the concept of diadromy, which also implies seasonality and regularity in migration (Myers, 1949; McDowall, 2001). The term “nomadic” has been proposed to describe fish movements that lack seasonality nor any clear temporal regularity of habitat change (Daverat et al., 2006). In this study, we merged the terms diadromous and nomadic to

describe those fish that migrate between salt and freshwater with no apparent timing or temporality.

A third term usually associated with intraspecific variability in habitat use is “contingent”, originally defined by Clark (1968) as a group of fish that, once established, appears to maintain its integrity by engaging in a distinct pattern of seasonal migration not shared by fish of other contingents. Therefore, the four habitat use patterns described in this study may be classified into two contingents: the first comprised of resident individuals and the second, diadromous-nomadic fish. Finally, the term “landlocked” has been used to refer to populations that are restricted to freshwater habitats that are not necessarily physically isolated from the ocean (McDowall, 2008).

Lycengraulis grossidens is a euryhaline fish species that exhibits a high degree of behavioral plasticity in the use of freshwater, estuarine and marine environments (Mai and Vieira, 2013). A similar phenomenon has been observed in several *Anguilla* species (Arai et al., 2003; Daverat et al., 2006), *Alosa* species, *Salmo trutta* (Limburg et al., 2001a,b; Magath et al., 2013), *Liza ramada* and *Platytyctys flesus* (Daverat et al., 2011). As stated previously, previous studies have suggested a variety of habitat use strategies of *L. grossidens*. In the present study, we show that these different strategies are all possible and that they can also occur simultaneously within a single population, which is consistent with the concept of partial migration (Chapman et al., 2012). Some species from the Engraulididae family have already been classified as partial migrants, such as *Engraulis encrasicolus* (Morais et al., 2010) and *Colia mystus* (Yang et al., 2006).

Most published empirical and theoretical studies that attempt to simplify ecological processes consider conspecific individuals as ecologically equivalent, often ignoring interindividual variability (Bolnick et al., 2003). Our analyses allowed us to group *L. grossidens* as freshwater residents, estuarine/marine residents and diadromous/nomadic type A and B individuals (see figures 3 and 4). These four habitat

use patterns, also referred to as contingents, co-occur and are present simultaneously in many sites along the southwestern Atlantic Ocean, in varying proportions according to the sampling region. Apparently, the proportion of diadromous/nomadic contingents increases from the north to the south.

According to Chapman et al. (2012), the decision to migrate or remain resident is an adaptive response to temporal fluctuations in resource availability or predation pressure, and any individual fish will attempt to maximize its evolutionary fitness. Studies evaluating the costs and benefits of migratory versus resident behaviors in fishes are rare. In these studies, widespread variations in “personality” are thought to occur that influence individual-level migratory behavior and other interactions such as predation risk and system-size (Chapman et al., 2011b; Skov et al., 2011). The proximate mechanisms of divergence between alternative life history strategies appear to be species-specific. For example, large *Salvelinus alpinus* are anadromous, whereas small ones are freshwater residents (Arai et al., 2002). The opposite pattern has been observed in *Salmo trutta*, with a larger proportion of migrants among small fish than among large ones (Arai et al., 2002). In cyprinids, the existence of partial migration has been associated with a trade-off between predation risk and food availability safety from predation and access to food differently depending on their body condition (Brodersen et al., 2008).

In birds, density-dependent winter survival in the habitat shared by migrants and non-migrants was identified as the most crucial requirement for the coexistence of the two strategies; environmental stochasticity was not important for maintaining partial migration (Kaitala et al., 1993). At the same time is important to recognize that there are no density estimates available for *L. grossidens* in our sampling area; however, there is some evidence to suggest that this species is more abundant at high latitudes and even supports artisanal and recreational fishing along the southern Brazilian and Argentinean Coasts (Fuster de Plaza and Boschi, 1961; Mai and Vieira, 2013). The southward increase in population abundance appears to coincide with the increased

percentage of migrants at high latitudes, which corroborates the idea that intraspecific density-dependence may be an important factor influencing migration in *L. grossidens*.

Where landlocked contingents have been recorded (Uruguay River and Mirim Lagoon), there are no effective barriers preventing access to the sea. In the Rio Uruguay, there are records of *L. grossidens* using the fish passage system at Salto Grande Dam (Espinach Ros and Parodi, 1997; Oldani et al., 2007). At Mirim Lagoon, where we observed partial migration, the fish passage system of the São Gonçalo channel provides an opportunity for partial migration. These findings demonstrate that at least part of the population prefers to live in fresh water.

This species shows intraspecific migratory variation, with residents and migrant individuals cohabiting the same areas. Given this flexibility in habitat use, it is reasonable to conclude that *L. grossidens* is generally capable of surviving and maintaining populations over a range of salinities, which directs our attention to the evolutionary pathways underlying such flexibility.

Evolutionary ecology implications

Although this family consists primarily of marine species, the genus *Lycengraulis* first appeared in freshwater after a transition from marine to freshwater habitats during the Miocene, with *Lycengraulis batesii* as the basal lineage (Bloom and Lovejoy, 2012). *Lycengraulis grossidens* appeared as a secondary marine fish species, particularly in the Atlantic Ocean. This fact may help explain its plasticity in transitioning between habitats presenting different physiological requirements, such as freshwater and coastal areas.

The landlocked contingents from Mirim Lagoon and Uruguay River invite the following question: Will they become reproductively isolated? According to McDowall (2008), two population contingents may become reproductively isolated from each other, which may lead to speciation. In the *Odontesthes perugiae* species complex from the same geographical region, freshwater resident populations may be undergoing rapid speciation (Beheregaray et al., 2002). Currently, there are insufficient

data to support the isolation scenario; however, ongoing genetic studies will help answer this question and reveal whether speciation is underway.

In conclusion, our results indicate that *L. grossidens* exhibits at least four habitat use patterns, including landlocked populations (e.g., Uruguay River), populations with freshwater residents coexisting with diadromous/nomadic contingents (e.g., Mirim Lagoon), marine or estuarine resident populations (e.g., Bahia), and marine or estuarine residents coexisting with diadromous/nomadic individuals (e.g., Patos Lagoon, Pernambuco). In addition, the percentage of diadromous individuals appears to vary with latitude, with individuals from lower latitudes (between 7 to 25°S) tending towards estuarine or marine life cycles and those of higher latitudes (30 to 36°S) tending towards freshwater habitats, at least during the early life stages.

Acknowledgements

This work was carried out under a doctoral degree fellowship (CNPq-870594/1997-4). We are grateful to Luis F. Marins, Alexandre M. Garcia and José H. Muelbert for valuable comments. Thanks to Fabio L. Rodrigues, Leonardo E. Moraes, Alicia P. Acuña, Marcelo F. Nóbrega, Luis G. Cardoso, and Débora Troca for providing samples, and thanks to all the workmates of the Ichthyology Laboratory (FURG). This work is a contribution of PELD (Brazilian Long Term Ecological Research Program; CNPq - Proc. Peld-403805/2012-0) and SISBIOTA (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade; CNPq-FAPERGS -563263/2010-5).

References

- Acha, E.M., Mianzan, H., Guerrero, R., Carreto, J., Giberto, D., Montoya, N., Carignan, M. 2008. An overview of physical and ecological processes in the Rio de la Plata Estuary 28, 1579-1588.
- Albuquerque, C.Q., Miekeley, N., Muelbert, J.H. 2010. Whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, trapped in a freshwater coastal lagoon: a natural

- comparison of freshwater and marine influences on otolith chemistry. *Neotropical Ichthyology* 8(2), 311-320.
- Albuquerque, C.Q., Miekeley, N., Muelbert, J.H., Walther, B.D., Jaureguizar, A.J. 2012. Estuarine dependency in a marine fish evaluated with otolith chemistry. *Marine Biology* 159, 2229-2239.
- Arai, T., Kotake, A., Aoyama, T., Hayano, H., Miyazaki, N. 2002. Identifying sea-run brown trout, *Salmo trutta*, using Sr:Ca ratios of otolith. *Ichthyological Research* 49, 380-383.
- Arai, T., Kotake, A., Ohji, M., Miller, M.J., Tsukamoto, K., Miyazaki, N. 2003. Occurrence of sea eels of *Anguilla japonica* along the Sanriku Coast of Japan. *Ichthyological Research* 50, 78-81.
- Barletta, M., Jaureguizar, A.J., Baigun, C., Fontoura, N.F., Agostinho, A.A., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Torres, R.A., Jimenes-Segura, L.F., Giarrizzo, T., Fabré, N.N., Batista, V.S., Lasso, C., Taphorn, D.C., Costa, M.F., Chaves, P.T., Vieira, J.P., Corrêa, M.F.M. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology* 76, 2118-2176.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., Briscoe, D.A. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 65-73.
- Bloom, D.D., Lovejoy, N.R. 2012. Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). *Journal of Evolutionary Biology* 25, 701-715.
- Bohlin, T., Pettersson, J., Degerman, E. 2001. Population density of migratory and resident brown trout *Salmo trutta* in relation to altitude: evidence for a migration cost. *Journal of Animal Ecology* 70, 112-121.
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Fordyce, J.A., Yang, L.H., Davis, J.M., Hulsey, C.D., Foriste, M.L. 2003. The Ecology of Individuals: Incidence and Implications of

- Individual Specialization. *The American Naturalist* 161, 1-28.
- Bortoluzzi, T., Aschenbrenner, A.C., Silveira, C.R., Roos, D.C., Lepkoski, E.D., Martins, J.A., Goulart, M.G., Querol, E., Querol, M.V. 2006. Hábito alimentar da sardinha prata, *Lycengraulis grossidens* (Spix and Agassiz, 1829), (Pisces, Engraulidae), Rio Uruguai médio, sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biodiversidade Pampeana* 4, 11-23.
- Brodersen, J., Nilsson, P.A., Hansson, L.-A., Skov, C., Brönmark, C. 2008 Condition dependent individual decision-making determines cyprinid partial migration. *Ecology* 89, 1195-1200.
- Burns, M.D.M., Garcia, A.M., Vieira, J.P., Bemvenuti, M.A., Marques, D.M.L.M., Condini, V. 2006. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 4, 69-72.
- Busoli, R.O., Muelbert, J.H. 2003. Environmental factors and ichthyoplankton dynamics in the zone of Cassino sandy Beach (32° 10'S, 52° 20'W). *Journal of Coastal Research* 35, 463-471.
- Campana, S.E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series* 188, 263-297.
- Clark, J. 1968. Seasonal movements of striped bass contingents of Long Island Sound and the New York Bight. *Transactions of the American Fisheries Society* 97, 320-343.
- Casselman, J.M. 1982. Chemical analyses of the optically different zones in eel otoliths. *Ontario Fisheries Technical Report Series* 4, 74-82.
- Chao, L.H., Pereira, L.E., Vieira, J.P. 1985. Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study. In: Yanez-Arancibia, A. (Ed.), *Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration*. DR(R) UNAM Press, Mexico, pp. 429-450.
- Chapman, B.B., Brönmark, C., Nilsson, J-A, Hansson, L-A. 2011a. The ecology and

evolution of partial migration. *Oikos* 120, 1764-1775.

- Chapman, B.B., Hulthén, K., Blomqvist, D.R., Hansson, L.-A., Nilsson, J.-A., Brodersen, J., Nilsson, P. A., Skov, C., Brönmark, C. 2011b. To boldly go: individual differences in boldness influence migratory tendency in a cyprinid fish. *Ecology Letters* 14, 871-876.
- Chapman, B.B., Skov, C., Hulthén, K., Brodersen, J., Nilsson, P.A., Hansson, L.-A., Brönmark, C. 2012. Partial migration in fishes: definitions, methodologies and taxonomic distribution. *Journal of Fish Biology* 81, 479-499.
- Cirano, M., Lessa, G.C. 2007. Oceanographic characteristics of baía de Todos os Santos, Brazil. *Revista Brasileira de Geofísica* 25, 363-387.
- Coimbra, J.C., Carreño, A.L., Geraque, E.A., Eichler, B.B. 2007. Ostracodes (Crustacea) from Cananéia-Iguape estuarine/lagoon system and geographical distribution of the mixohaline assemblages in southern and southeastern Brazil. *Iheringia* 97, 273-279.
- Daverat, F., Limburg, K.E., Thibault, I., Shiao, J.C., Dodson, J.J., Caron, F., Tzeng, W., Iizuka, Y., Wickström, H. 2006. Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species, *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* 308, 231-241.
- Daverat, F., Martin, J., Fablet, R., Pécheyran, C. 2011. Colonisation tactics of three temperate catadromous species, eel *Anguilla anguilla*, mullet *Liza ramada* and flounder *Plathychtys flesus*, revealed by Bayesian multielemental otolith microchemistry approach. *Ecology of Freshwater Fish* 20, 42-51.
- de Vries, M.C., Gillanders, B.M., Elsdon, T.S. 2005. Facilitation of barium uptake into fish otoliths: influence of strontium concentration and salinity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 4061-4072.
- Elsdon, T.S., Gillanders, B.M. 2006. Identifying migratory contingents of fish by combining otolith Sr:Ca with temporal collections of ambient Sr:Ca concentrations. *Journal of Fish Biology* 69, 643-657.

- Elsdon, T.S., Wells, B.K., Campana, S.E., Gillander, B.M., Jones, C.M., Limburg, K.E., Secor, D.H., Thorrold, S.R., Walther, B.D. 2008. Otolith chemistry to describe movement and life history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. In: Gibson, R.N., Atkinson, R.J.A., Gordon, J.D.M. (Eds.), *Oceanography and Marine Biology*, *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Taylor & Francis, Oxon, pp. 297-330.
- Espinach Ros, A., Parodi, C.R. 1997. Conservación de la fauna ictica en el embalse de Salto Grande. Publicacion de la comision administradora del Rio Uruguay y la comision tecnica mixta de Salto Grande, Montevideo, 41 pp.
- Fuster de Plaza, M.L., Boschi, E.E. 1961. Areas de migracion y ecologia de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en las aguas argentinas (Pisces, fam. Engraulididae). *Fac. Cien. Exactas Naturales* 1(3), 127-183.
- Jiang, T., Yang, J., Liu, H., Shen, X. 2012. Life history of *Coilia nasus* from the Yellow Sea inferred from otolith Sr:Ca ratios. *Environmental Biology of Fishes* 95, 503-508.
- Kaitala, A., Kaitala, V., Lundberg, P. 1993. A Theory of Partial Migration. *The American Naturalist* 142(1), 59-81.
- Kerr, L.A., Cadrin, S.X., Secor, D.H. 2010. The role of spatial dynamics in the stability, resilience, and productivity of an estuarine fish population. *Ecological Applications* 20(2), 497-507.
- Krumme, U., Saint-Paul, U., Rosenthal, H. 2004. Tidal and diel changes in the structure of a nekton assemblage in small intertidal mangrove creeks in northern Brazil. *Aquat. Living Resour Aquatic Living Resources* 17, 215-229.
- Limburg, K.E., Blackburn, I., Schmidt, R., Lake, T., Hasse, J., Elfman, M., Kristiansson, P. 2001a. Otolith microchemistry indicates unexpected patterns of residency and anadromy in blueback herring, *Alosa aestivalis*, in the Hudson and Mohawk Rivers. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 362, 931-938.

- Limburg, K.E., Landergren, P., Westin, L., Elfman, M., Kristiansson, P. 2001b. Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: making the most of marginal spawning streams. *Journal of Fish Biology* 59, 682-695.
- Macdonald, J.I., Crook, D.A. 2010. Variability in Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water and fish otoliths across an estuarine salinity gradient. *Marine Ecology Progress Series* 413, 147-161.
- Magath, V., Marohn, L., Fietzke, J., Frische, M., Thiel, R., Dierking, J. 2013. Migration behaviour of twaite shad *Alosa fallax* assessed by otolith Sr:Ca and Ba:Ca profiles. *Journal of Fish Biology* 82, 1871-1887.
- Mai, A.C.G., Vieira, J.P. 2013. Current knowledge of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Pisces, Clupeiformes, Engraulididae). *Biota Neotropica* 13(3), 01-10.
- Mastrarrigo, V. 1947. La sardinha de la cuenca del Río de la Plata (*Lycengraulis olidus*) (Günther). Ministério de Agricultura, Montevideo, 11 pp.
- McDowall, R.M. 2001 Diadromy, diversity and divergence: implications for speciation processes in fishes. *Fish and Fisheries* 2, 278-285.
- McDowall, R.M. 2008. Diadromy, history and ecology: a question of scale. *Hydrobiologia* 602, 5-14.
- Mont'Alverne, R., Moraes, L.E., Rodrigues, F.L., Vieira, J.P. 2012. Do mud deposition events on sandy beaches affect surf zone ichthyofauna? A southern Brazilian case study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 102-103, 116-125.
- Morais, P., Babaluk, J., Correia, A.T., Chicharo, M.A., Campbell, J.L., Chicharo, L. 2010. Diversity of anchovy migration patterns in an European temperate estuary and in its adjacent coastal area: Implications for fishery management. *Journal of Sea Research* 64, 295-303.
- Moura, P., Vieira, J. P., Garcia, A.M. 2012. Fish abundance and species richness across an estuarine-freshwater ecosystem in the Neotropics. *Hydrobiologia* 696, 107-122.

- Myers, G.S. 1949. Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia* 1949, 89-97.
- Oldani, N., Baigún, C., Nestler, J.M., Goodwin, R.A. 2007. Is fish passage technology saving fish resources in the lower La Plata River basin? *Neotropica Ichthyology* 5(2), 89-102.
- Piola, A.R., Möller, O.O., Guerrero, R.A., Campos, E.J.D. 2008. Variability of the subtropical shelf front off eastern South America: Winter 2003 and summer 2004. *Continental Shelf Research* 28, 1639-1648.
- Ramos, L.A. 2005. Auto-ecologia de *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Clupeiformes, Engraulididae) em estuários do Rio Grande do Sul e sua pesca na barra do rio Tramandaí, RS, Brasil. Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, unpublished.
- Reis-Filho, J.A., Nunes, J.A.C.C., Ferreira, A. 2010. Estuarine ichthyofauna of the Paraguaçu River, Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Biota Neotropica* 10(4), 301-311.
- Rodrigues, F.L., Vieira, J.P. 2012. Surf zone fish abundance and diversity at two sandy beaches separated by long rocky jetties. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 1-9.
- Secor, D.H., Rooker, J.R. 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fisheries Research* 46, 359-371.
- Secor, D.H., Rooker, J.R., Zlokovitz, E., Zdanowicz, V.S. 2001. Identification of riverine, estuarine, and coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints. *Marine Ecology Progress Series* 211, 245-253.
- Secor, D.H. 2010. Is otolith science transformative? New views on fish migration. *Environmental Biology of Fishes* 89, 209-220.
- Seeliger, U., Odebrecht, C. 2010. O Estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. FURG, Rio Grande, pp. 180.

- Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J. P. 1997. Subtropical Convergence Environments: The Coast And Sea In The Southwestern Atlantic. Springer-Verlag, Berlim, pp. 308.
- Skov, C., Baktoft, H., Brodersen, J., Brönmark, C., Chapman, B.B., Hansson, L.-A., Nilsson, P.A. 2011. Sizing up your enemy: individual predation vulnerability predicts migratory probability. *Proceedings of the Royal Society B* 278, 1414-1418.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Tulp, I., Keller, M., Navez, J., Winter, H.V., Graaf, M., et al. 2013 Connectivity between migrating and landlocked populations of a diadromous fish species investigated using otolith microchemistry. *PLoS ONE* 8(7), e69796.
- Vieira, J.P., Garcia, A.M., Moraes, L. 2010. A assembléia de peixes. In *Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil*. In: Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. (Eds.), *Ecoscientia*, Rio Grande, pp.77-88.
- Wang, C., Hsu, C., Chang, C., You, C., Tzeng, W. 2010. The migratory environmental history of freshwater resident flathead mullet *Mugil cephalus* L. in the Tanshui River, northern Taiwan. *Zoological Studies* 49(4), 504-514.
- Weiss, G., Souza, J.A.F., Santos, A. 1976. Contribuição ao conhecimento do Ictioplankton marinho de plataforma sul do Brasil. *Atlântica* 1(1), 1-99.
- Whitehead, P.J.P., Nelson, G.J., Wongratana, T. 1988. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. *FAO Fish Synopsis*, Rome, 579 pp.
- Yang, J., Arai, T., Liu, H., Miyazaki, N., Tsukamoto, K. 2006. Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium. *Journal of Fish Biology* 69, 1120-1135.

Table 1. Characteristics of sampling areas for *Lycengraulis grossidens*. Number of otoliths sampled (N); minimum and maximum total length (TL) with means in parentheses. Latitude (LAT) and Longitude (LON)

Environment and Locality	Description	N	TL (mm)	LAT; LONG
Brackish, La Plata Estuary, Samborombon Bay, Argentina and Maldonado, Uruguay	Second largest estuarine system in South America with highly variable water salinity (0-32) and stratification during the year (Acha et al., 2008).	23	137-272 (179)	36°21'S; 056°42'W and 34°54'S; 054°45'W
Fresh water, Mirim Lagoon. Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, Brazil	This lagoon is approximately 200 km long and connects Mirim Lagoon with Patos Lagoon Estuary via the São Gonçalo Channel. One dam and a floodgate were built in 1977 to prevent the entrance of salt water. The temperature range is 10-31°C (Burns et al., 2006; Moura et al., 2012).	14	134-290 (243)	33°29'S; 053°29'W
Marine, Cassino Beach. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	Surf zone area adjacent to Patos Lagoon, where salinity varies between 10-37 and temperature between 10-24°C (Busoli and Muelbert, 2003; Mont'Alverne et al., 2012; Rodrigues and Vieira, 2012)	14	70-275 (150)	32°13'S; 052°10'W
Brackish, Patos Lagoon Estuary. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	The Patos Lagoon Estuary may show changes in salinity over hourly periods, but the average salinity (0-32) follows a seasonal pattern (dry summer and wet winter) influenced primarily by rainfall and wind direction (Seeliger et al., 1997; Seeliger and Odebrecht, 2010).	15	82-193 (108)	31°57'S; 052°05'W
Fresh water, Uruguay River. Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil	A dam 30 m in height with two Borland fish locks, installed in 1979, is located 550 km downstream. The temperature range is 16-30°C (Bortoluzzi et al., 2006; Oldani et al., 2007).	15	87-225 (189)	29°45'S; 057°06'W
Brackish, Mampituba Estuary. Passo de Torres, SC, Brazil	This small estuary has an area of 0.3-0.5 km ² . The water temperature fluctuations follow a seasonal pattern (19-25°C) (Ramos, 2005).	14	101-187 (141)	29°19'S; 049°43'W
Brackish, Ribeira Estuary. Iguape, São Paulo, Brazil	This area is separated from the ocean by Ilha Comprida. The area is seasonally influenced by river discharges with salinity values ranging from 8-33 (Coimbra et al., 2007).	14	129-260 (195)	24°44'S; 047°34'W
Marine, Todos os Santos Bay. Salvador, Bahia, Brazil	Salinity and water temperature values inside the bay range from 32-37 and 26-30°C, respectively. The circulation inside the bay is primarily tidally driven and does not vary significantly during the year (Cirano and Lessa, 2007)	15	92-189 (148)	12°48'S; 038°44'W
Marine, Pau Amarelo Beach. Paulista, Pernambuco, Brazil	Environment with little seasonal variation. Salinity range 33-36, water temperature range 26-29°C (M. F. Nóbrega, pers. comm.).	15	157-217 (193)	7°54'S; 034°47'W

Table II. Discriminant function analysis of element ratios for classifying the diadromous/nomadic, freshwater residents and estuarine/marine residents contingents.

	F-remove - (2,13)	p-level	Toler.
⁸⁶ Sr: ⁴³ Ca means	51.74	<0.001	0.40
⁸⁶ Sr: ⁴³ Ca Sd	22.72	<0.001	0.42
¹³⁸ Ba: ⁴³ Ca means	3.02	0.052	0.35
¹³⁸ Ba: ⁴³ Ca Sd	3.80	0.025	0.38

F-statistic measures relative importance of each element. Tolerance indicates redundancy of elements. 0 = high redundancy; 1 = low redundancy.

Table III. Discriminant analysis classification matrix. First column: percentage correct of observed classifications, other columns: observed classifications.

	Percent Correct	diadromous p=.48	freshwater p=.16	estuarine/marine p=.35
diadromous/nomadic	85	57	7	3
freshwater resident	87	3	20	0
estuarine/marine resident	90	5	0	44

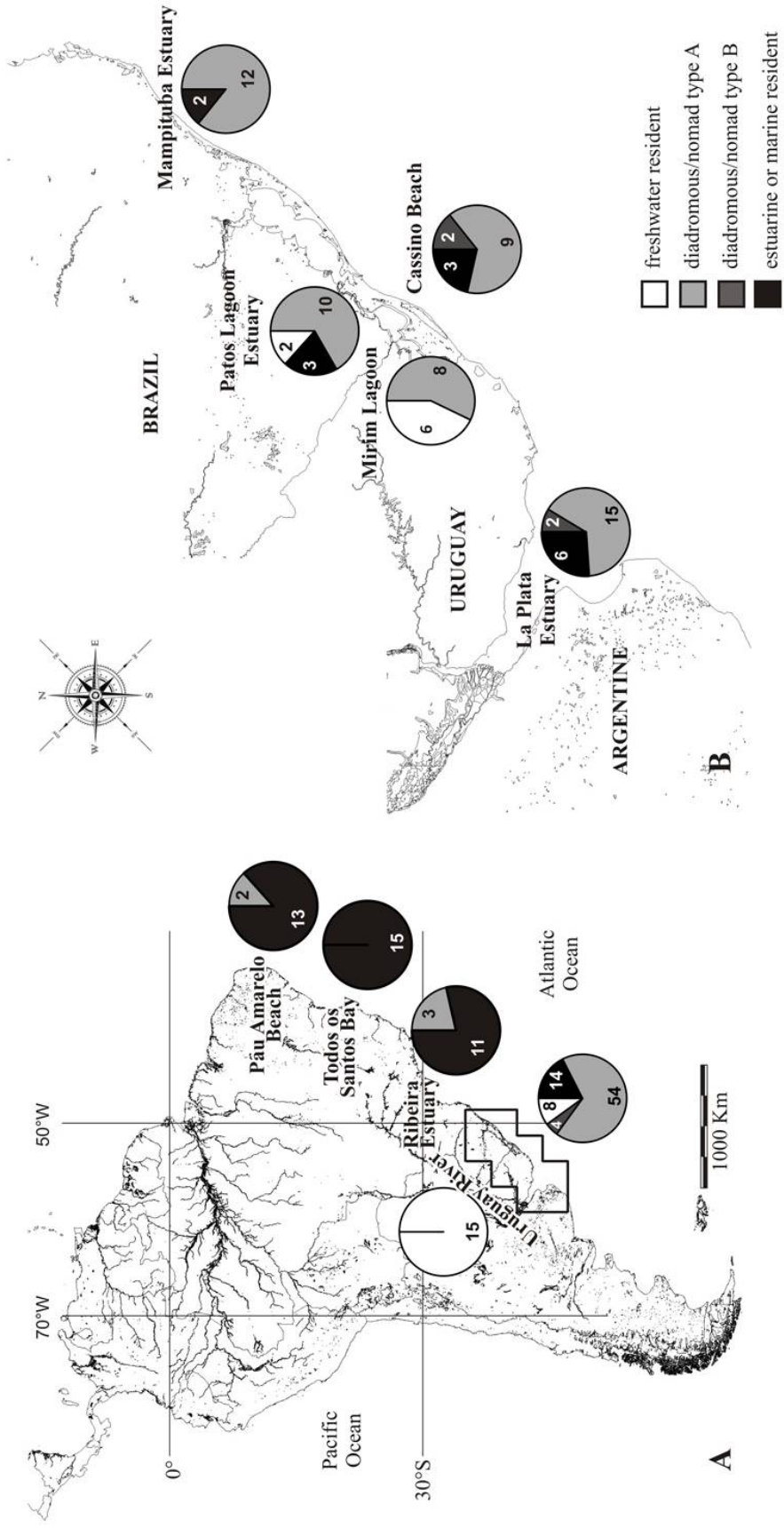


Fig. 1. Sample locations for *Lycengraulis grossidens* along the South American Coast. For each of the nine sampled regions, pie sectors are proportional to the relative contingents that were freshwater residents (white), estuarine or marine residents (black) and diadromous/nomadic type A (light gray) and type B (dark gray). A: Hydrological map of South America and B: Hydrological map of southern part of sample area.

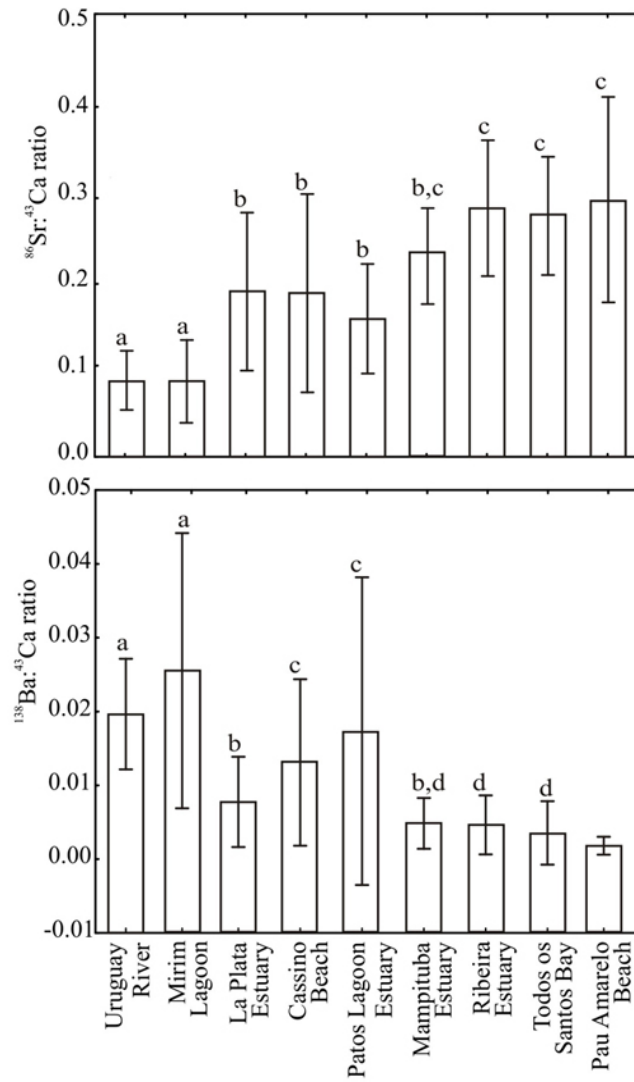


Fig. 2. *Lycengraulis grossidens* otolith border mean values (\pm SD) of $^{86}\text{Sr}:^{43}\text{Ca}$ and $^{138}\text{Ba}:^{43}\text{Ca}$ ratios observed in 9 locations. The same letter indicates non-significant differences in the otolith signature among habitats (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$).

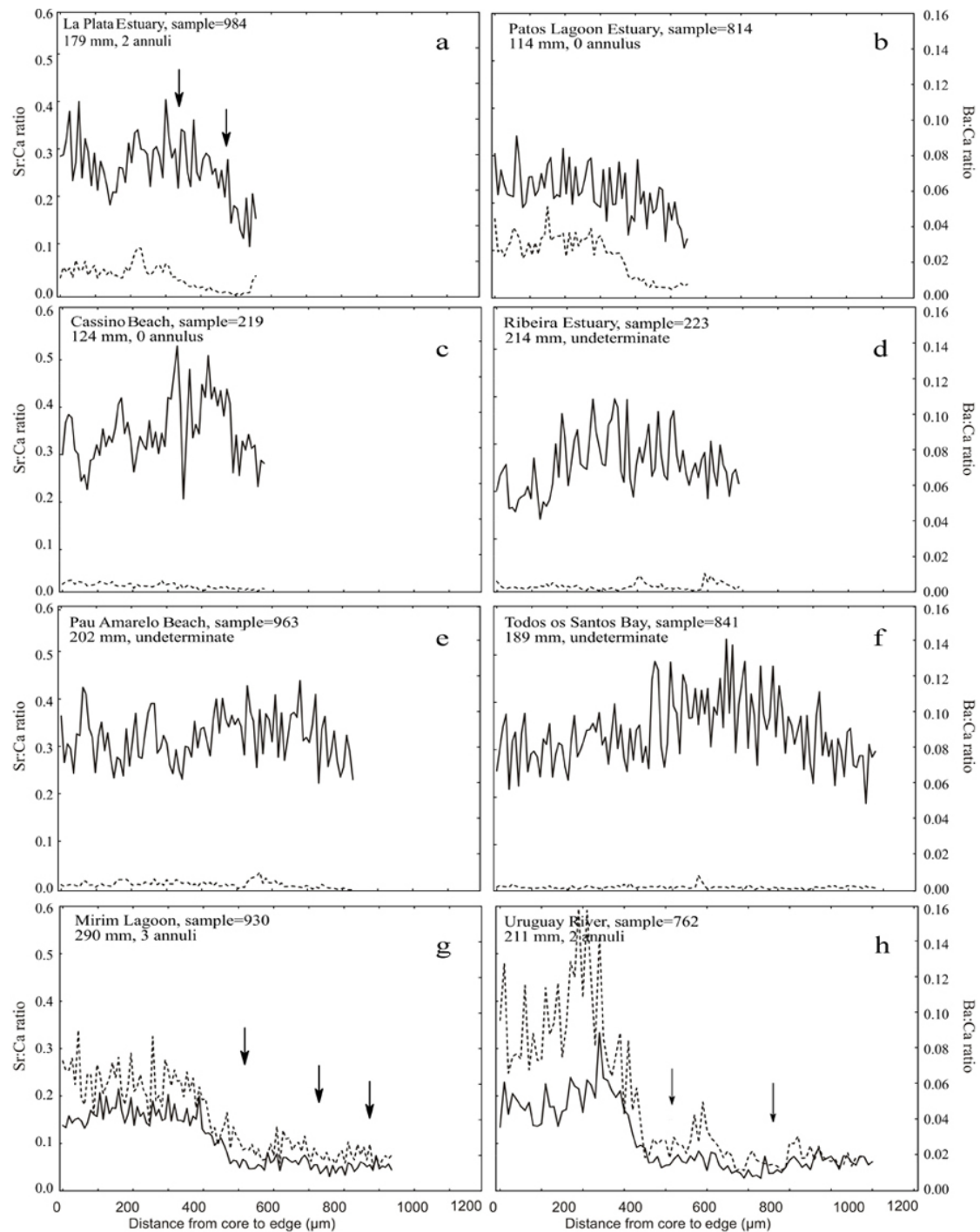


Fig. 3. Otolith transects of *Lycengraulis grossidens* measured by LA-ICP-MS from the core to the edge. Letters a, b, c, d, e, f: marine or estuarine residents, g-h: freshwater residents. ^{86}Sr : ^{43}Ca (solid line) and ^{138}Ba : ^{43}Ca (dotted line). For each fish, place of capture, identification code, total length (mm), and annulus number are indicated on the graph. The arrows represent annuli positions along the otolith transect.

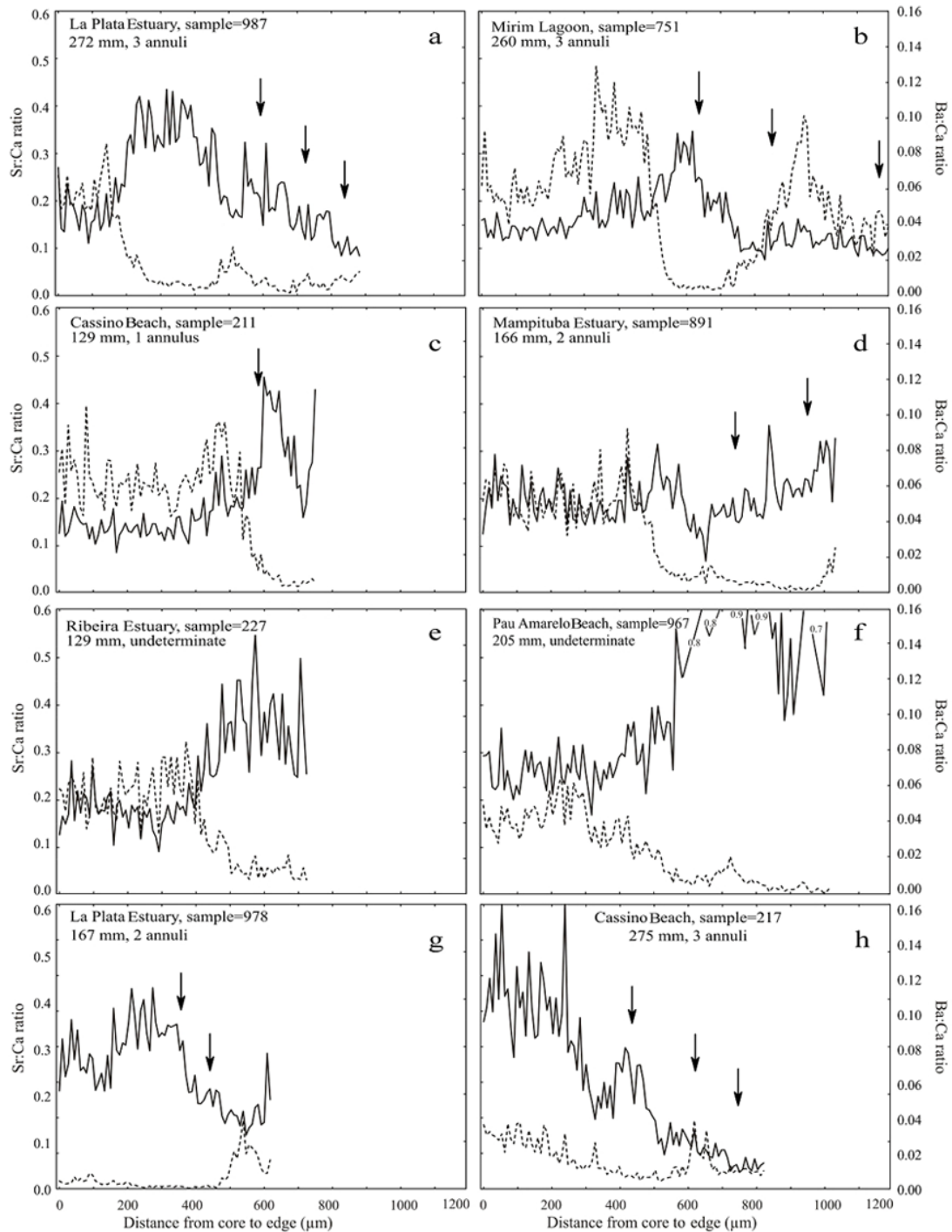


Fig. 4. Otolith transects of *Lycengraulis grossidens* measured by LA-ICP-MS from the core to the edge. Letters a, b, c, d, e, f: diadromous/nomadic type A, g-h: diadromous/nomadic type B. $^{86}\text{Sr}:$ ^{43}Ca (solid line) and $^{138}\text{Ba}:$ ^{43}Ca (dotted line). For each fish, place of capture, identification code, total length (mm), and annulus number are indicated on the graph. The arrows represent annuli positions along the otolith transect.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Mean (μ) and standard deviation of $^{86}\text{Sr}^{43}\text{Ca}$ ratio in horizontal line and in vertical line $^{138}\text{Ba}^{43}\text{Ca}$ ratio, based on the last ten values of otolith readings. Kruskal-Wallis test, p values, above diagonal $^{86}\text{Sr}^{43}\text{Ca}$ ratio, below diagonal $^{138}\text{Ba}^{43}\text{Ca}$ ratio, $df = 676$.

	Uruguay River	Mirim Lagoon	La Plata Estuary	Cassino Beach	Patos Lagoon Estuary	Mampituba Estuary	Ribeira Estuary	Todos os Santos Bay	Pau Amarelo Beach
Uruguay River	$\mu=0.083$ ± 0.034	$\mu=0.082$ ± 0.048	$\mu=0.186$ ± 0.091	$\mu=0.185$ ± 0.115	$\mu=0.155$ ± 0.064	$\mu=0.222$ ± 0.060	$\mu=0.282$ ± 0.079	$\mu=0.273$ ± 0.067	$\mu=0.291$ ± 0.118
Mirim Lagoon	$\mu=0.020 \pm 0.008$	1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
La Plata Estuary	$\mu=0.026 \pm 0.019$	1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Cassino Beach	$\mu=0.008 \pm 0.006$	<0.001	<0.001	1	0.389	0.27	<0.001	<0.001	<0.001
Patos Lagoon Estuary	$\mu=0.013 \pm 0.011$	<0.001	0.01	1	1	0.097	<0.001	<0.001	<0.001
Mampituba Estuary	$\mu=0.017 \pm 0.021$	<0.001	<0.001	1	1	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ribeira Estuary	$\mu=0.0005 \pm 0.003$	<0.001	0.51	<0.001	<0.001	<0.001	0.169	0.416	0.315
Todos os Santos Bay	$\mu=0.004 \pm 0.004$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1	1	1	1
Pau Amarelo Beach	$\mu=0.003 \pm 0.004$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1	1	1	1
	$\mu=0.002 \pm 0.001$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.029	

Tab. S2. Percentage of *Lycengraulis grossidens* behavioral contingents by sample site.

	Freshwater	Estuarine or	Diadromous/nomadic		Total
	resident	marine resident	type A	type B	
Uruguay River	15 (100%)	0	0	0	15
Mirim Lagoon	6 (43%)	0	8 (57%)	0	14
La Plata Estuary	0	6 (26%)	15 (65%)	2 (9%)	23
Cassino Beach	0	3 (22%)	9 (64%)	2 (14%)	14
Patos Lagoon Estuary	2 (13%)	3 (20%)	10 (67%)		
Mampituba Estuary	0	2 (14%)	12 (86%)	0	14
Ribeira Estuary	0	11 (79%)	3 (21%)	0	14
Todos os Santos Bay	0	15 (100%)	0	0	15
Pau Amarelo Beach	0	13 (87%)	2 (13%)	0	15

Anexo III

Isolation and characterization of 18 microsatellites for *Lycengraulis grossidens* (Pisces: Clupeiformes)

Ana C. G. Mai • João P. Vieira • Alicia A. Plavan •

Marcelo F. Nóbrega • Leonardo E. Moraes •

Fábio L. Rodrigues • Luis F. Marins

Publicado: Conservation Genetic Resources

DOI 10.1007/s12686-012-9718-2

Isolation and characterization of 18 microsatellites for *Lycengraulis grossidens* (Pisces: Clupeiformes)

Ana C. G. Mai · João P. Vieira · Alicia A. Plavan ·
 Marcelo F. Nobrega · Leonardo E. Moraes ·
 Fábio L. Rodrigues · Luis F. Marins

Received: 3 July 2012 / Accepted: 7 July 2012
 © Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Twelve polymorphic and six non-polymorphic microsatellite loci were isolated and characterized from a CT–GT enriched genomic library of *Lycengraulis grossidens*. The number of alleles ranged from 1 to 29. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.19 to 0.8 and from 0.18 to 0.95, respectively. Cross-species amplification of the markers developed for *L. grossidens* was successful in the wild Engraulididae species *Anchoa*

spinifer, *Anchoa marinii*, *Anchoviella lepidentostole*, *Cetengraulis edentulous* and *Engraulis anchoita*. The developed microsatellite loci are a potential powerful tool for studies of population genetics, genetic diversity and gene flow for these important food sources.

Keywords Engraulididae · *Anchoa* · *Anchoviella* · *Cetengraulis* · *Engraulis*

A. C. G. Mai (✉) · J. P. Vieira · L. E. Moraes · F. L. Rodrigues
 Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica,
 Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8,
 Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil
 e-mail: anacecilia_mai@yahoo.com.br;
 anaceciliamai@gmail.com

J. P. Vieira
 e-mail: vieira@mikrus.com.br

L. E. Moraes
 e-mail: lemoraes6@yahoo.com.br

F. L. Rodrigues
 e-mail: oceanolameiro@yahoo.com.br

A. A. Plavan
 Sección Oceanología, Facultad de Ciencias, Universidad
 de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay
 e-mail: acuplavan@gmail.com

M. F. Nobrega
 Laboratório de Biologia Pesqueira, Departamento
 de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal
 do Rio Grande do Norte, Praia de Mãe Luiza, Natal,
 RN CEP 59014-100, Brazil
 e-mail: marnobrega@hotmail.com

L. F. Marins
 Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal,
 Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8,
 Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil
 e-mail: dqmluf@furg.br

Engraulididae (suborder Clupeiformes) fishes are usually found at shoals along the coasts of tropical and sub-tropical regions with few species living in temperate regions (Whitehead et al. 1988). Most of the species feed on plankton, with few species being piscivorous during the adult stages and many species have economic importance as fisheries resources. Currently, sixteen genera of Engraulididae are valid (Froese and Pauly 2011) and the genus *Lycengraulis* comprises four species, *L. grossidens*, *L. poeyi*, *L. batessi* and *L. limnichthys*. *L. grossidens* is widely distributed in the coastal zone from Belize to Argentina, including populations restricted to freshwater (Whitehead et al. 1988).

Microsatellite DNA loci were isolated of one individual as described in Billotte et al. (1999). The library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite probes. The selected fragments were amplified by PCR using primer sequences complementary to the adapters and then cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into XL-1 blue cells and transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 µg/ml of X-galactosidase. Ninety-six clones contained inserts (white colonies) were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and automated ABI 377 sequencer (Applied Biosystems).

About 62 sequenced clones presented microsatellite motifs, from which 30 primer pairs were designed using the Primer3Plus web interface program (Untergasser et al. 2007).

Twenty-five *L. grossidens* individuals were randomly sampled from eight different locations along the West South Atlantic coast: Rio Grande do Sul (33°27'S, 53°31'W;

32°17'S, 52°10'W; 32°00'S, 52°05'W), São Paulo (24°44'S, 47°33'W), Bahia (12°44'S, 38°54'W), Pernambuco (7°54'S, 34°47'W) and Piauí (2°54'S, 41°24'W), Brazil. And more 30 individual from Maldonado, Uruguay (34°55'S, 54°51'W) were sampled to calculated Hardy–Weinberg equilibrium.

Table 1 Loci names, the GenBank accession number, repeat motif, optimal annealing temperature (Ta), the forward (F) and reverse (R) primer sequence, total number of alleles per locus (A)

SSR locus/ GenBank accession no.	Repeat motif	Ta (°C)	Primer sequences (5'–3')	A	Size range (bp)	HO/HE
Al JQ659014	(GT) ₁₄ N...N(AG) ₈	60	F: GTGTGTGCGGTTAGAGAC R: TTTTCCTCTCCCTCTCTCG	22	198–266	0.80/0.87
A4 JX241462	(GT) ₁₄	60	F: GCAGATCAGAGGGTTGGTTTATG R: CAAAGAGACTCACAAAAATGTATGC	8	126–148	0.67/0.8
B4 JX241463	(GT) ₆ A(TG) ₁₉	60	F: TGTTCACAAAACCTGGTTGACTG R: CTTTGGTCTGTTCCTCAGGTCT	12	140–176	0.74/0.88
B9 JQ659015	(AC) ₅ N...N(AC) ₁₄ AG(AC) ₇	60	F: TCCTGCAGGTCTCTAAAACCA R: ACGTGTGAGGCTGAGAGTGTC	29	208–240	0.57/0.80*
C4 JQ659016	(GT) ₈	62	F: TTTTGTAAATGAAAGAGCGGTGT R: CAAGTCTTGACGTTAAATAGTGTGA	7	148–162	0.19/0.18
C6 JQ659017	(AC) ₂₉	60	F: TTGTCGAGCTGAGGAGATGAC R: GGAGTCATCTGTTTGCCTGAT	28	208–288	0.71/0.9
C7 JX241464	(GA) ₁₀	60	F: GGAAAGAATGAGAGAGAGTGCAA R: AAACGACTGATCTGGGACAGAC	3	158–162	0.37/0.4
D4 JX241466	(TG) ₁₇	60	F: GGAGTGGGTAACCTGAGTGTGTG R: GTATCTTGAGCAATCCGTGCT	5	164–210	0.37/0.47
D7 JQ659018	(GT) ₃₇	60	F: AATCACATCGTGGCATGTGTA R: TGAGGAATCATTTTCATCATCG	22	166–220	0.43/0.91*
D8 JQ659019	(TG) ₉	60	F: TGTCAAACCTGAATCCTGAATGTG R: ACACGCACAAGTAGACGGAAG	9	196–228	0.71/0.9
D12 JQ659020	(TG) ₂₈	62	F: ACAAAGCTTTGTACCCGAAG R: ATTTTACAGGGTGGAGCAGTG	28	186–276	0.78/0.9
G8 JQ659021	(GT) ₂₅	58	F: AACCAAACACCACCATTTTCAG R: TGTAGAACACCAACCAGGAG	23	192–278	0.64/0.95
A3 JQ659024	(TG) ₂₃ C(GT) ₃ GCGTA(TG) ₇ C(GT) ₁₈	60	F: AGATTAGTGTGATTGACACACCTG R: TCGCTTTGGATAAAAGTGTCC	1	198	–
D2 JQ659022	(CA) ₈ A(AC) ₁₃ TGCATG (CA) ₁ , G(AC) ₁	54	F: TGCATTAGAACGCTTGACTTG R: TGAGTTTCTGTTGGAGGGTGT	2	208–228	–
E3 JX241470	TG ₉	60	F: GGGGACACAGCAGAAGACAT R: ACACAAAAGCACACCCACAAG	2	157–161	–
HI JX241469	(TG) ₅ N...N(GT) ₆	58	F: TGTGTGCGCGTACGTGTG R: GGAAGTGCAGAGAACATACACCA	2	118–200	–
H3 JQ659025	(AC) ₁₃	60	F: CTTGATGATAACGTCCCAAC R: GGGTGGTGCAACATGAAATAC	2	160–164	–
H6 JQ659023	(AC) ₁₀	60	F: TGGCTAACAGGAGTAGGAC R: TGAAAGACAGCCCTGACACC	2	188–194	–

HO observed heterozygosity, HE expected heterozygosity

* HO significantly from HE with $P < 0.01$, calculated for 30 individuals from Maldonado, Uruguay

Table 2 Cross-species amplification of *L. grossidens* Benth microsatellite markers in five Engraulididae species

	Microsatellite loci											
	A1	A4	B4	B9	C4	C6	C7	D4	D7	D8	D12	G8
<i>A. marinii</i>	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+
<i>A. spinifer</i>	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	–	+
<i>A. lepidentostole</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
<i>C. edentulus</i>	–	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+
<i>E. anchoita</i>	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+

* PCR product amplified using temperature range provided in Table 1, + successful amplification, – unsuccessful amplification

Genomic DNA was isolated using a phenol–chloroform extraction protocol (Sambrook et al. 1989) for the characterization of the isolated microsatellites. PCR amplifications of the microsatellites were carried out in 12.5 µl containing 1.25 µl 1× PCR buffer, 0.375 µl 100 mM MgCl₂, 1 µl 10–50 ng genomic DNA, 1.25 µl 10 mM for each primer, 0.25 µl 10 mM dNTPs and 0.1 µl Taq DNA polymerase (Invitrogen) on a PTC-100 thermocycler (MJ Research). The amplifications were programmed using the following conditions: 94 °C for 4 min, then 35 cycles at 94 °C for 30 s, proper temperature (Table 1) for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. Denatured amplified products were separated on 6 % denaturing polyacrylamide gels using silver staining as described by Creste et al. (2001). Allele sizes were estimated by comparison to a 10 bp and 50 bp DNA ladder standard (Invitrogen).

Out of 30 microsatellite loci developed for *L. grossidens*, 5 did not successfully amplify in PCR, 7 did not show clear bands and 6 resulted in monomorphic PCR products. Twelve primers pairs amplified readable and polymorphic PCR products. The characteristics of the primers pairs and the optimal annealing temperature are given in Table 1.

The number of alleles ranged from 1 to 29. The observed and expected heterozygosity calculated using the program Arlequin (v. 3.5) for 35 individuals from Maldonado, Uruguay, ranged from 0.19 to 0.8 and from 0.18 to 0.95, respectively. The analysis indicated that B9 and D7 loci showed significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium, suggesting significant heterozygote deficit for these loci (Table 1).

The microsatellite markers described in the present work are the first isolated from *Lycengraulis* genus. These markers will be useful in studies of genetic diversity, gene flow and genetic structure populations of *L. grossidens*. Currently, there are two uncertainties about species populations. The first one refers to degree of isolation of freshwater populations, especially those isolated by dams

(Bortoluzzi et al. 2006). The second one could be applied to subpopulations studies throughout Brazilian, Uruguayan and Argentinean coasts, which current occurrence and distribution was implied based on morphometric and meristic characters (Silva 2006).

The primers sets showed polymorphic were also tested without extra optimization in several others Engraulididae species, such as *A. marinii*, *A. spinifer*, *A. lepidentostole*, *Cetengraulis edentulus*, and *E. anchoita*. At least seven microsatellite loci amplified in each species (Table 2), indicating that these markers are potentially useful for a wide range of population studies of South American anchovies. These include commercially important species, which have been under great fishing pressure, such as *A. lepidentostole* (São Paulo and Rio de Janeiro states, Brazil), *C. edentulus* (Brazil and Venezuela), and *E. anchoita* (Uruguay and Argentina) (Whitehead et al. 1988; Silva et al. 2003). *Anchoa* has no commercial value (Silva et al. 2003), but microsatellite markers can be useful for phylogenetic and phylogeographic studies of Engraulididae.

One of the most important applications of genetic markers (including microsatellite) in fisheries is the identification of distinct populations, or stocks, to establish regulation in fishing management (Kapuscinski and Miller 2007). Hence, the microsatellite markers described here could be useful in fishery studies and conservation of Engraulididae species in SW Atlantic coast.

Acknowledgments This work was carried out under a PhD fellowship (CNPq-870594/1997-4). Thank the teachers PhD. Anete P. Souza and PhD. Maria I. Zucchi, PhD. Danilo Augusto monitors and classmates the course of microsatellites in 2010 (UNICAMP). Thanks special to Teresa Thomé and, Luciana Fusinato. We are grateful to PhD. Alexandre M Garcia and PhD. José H. Müelbert for providing valuable comments. We also would like to thank to Obelix, Filipe Fernandes, Felipe Toledo, André Braga, Vita Magalhães, Fabíola Fogaça, Alitiene M. Pereira, Jefferson F. A. Legat, Renan Peixoto, Lise M. Ferreira, Haig T. Ng, and all the workmates of Ichthyology and Molecular Biology Laboratory (FURG).

References

- Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- Bortoluzzi T, Aschenbrenner AC, Silveira CR, Roos DC, Lepkoski ED, Martins JA, Goulart MG, Querol E, Querol MV (2006) Hábito alimentar da sardinha prata *Lycengraulis grossidens* (Spix and Agassiz, 1829) (Pisces, Engraulidae), Rio Uruguai médio, sudoeste do Rio Grande do Sul, Brazil. *Biodivers Pampeana* 4:11–23
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19:299–306. doi:10.1007/BF02772828
- Froese R, Pauly D (eds) (2011) FishBase. World wide web electronic publication. www.fishbase.org. Accessed 16 Dec 2011
- Kapuscinski AR, Miller LM (2007) Genetic guidelines for fisheries management, 2nd edn. University of Minnesota, Minnesota
- Sambrook J, Fritscher EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual cold spring. Harbor Laboratory Press, New York
- Silva MA (2006) Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz 1829) ao longo da costa brasileira. Dissertation, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- Silva MA, Araújo FG, Azevedo MCC, Mendonça P (2003) Spatial and temporal distribution of *Cetengraulis edentulus* (Cuvier) (Actinopterygii-Engraulidae) in the Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev bras zool* 20:577–581
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35:W71–W74
- Whitehead PJP, Nelson GJ, Wongratana T (1988) FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf-herrings. Part 2. Engraulidae FAO. *Fish Synop* 7:305–579