



Universitat de Girona

ELS LÍMITS I LES RELACIONS ENTRE ELS PEIXOS ACANTHOPTERYGII : FILOGÈNIA MOLECULAR DE MUGILOMORPHA I ATHERINOMORPHA

Sandra HERAS MENA

ISBN: 978-84-693-6517-5

Dipòsit legal: GI-I037-2010

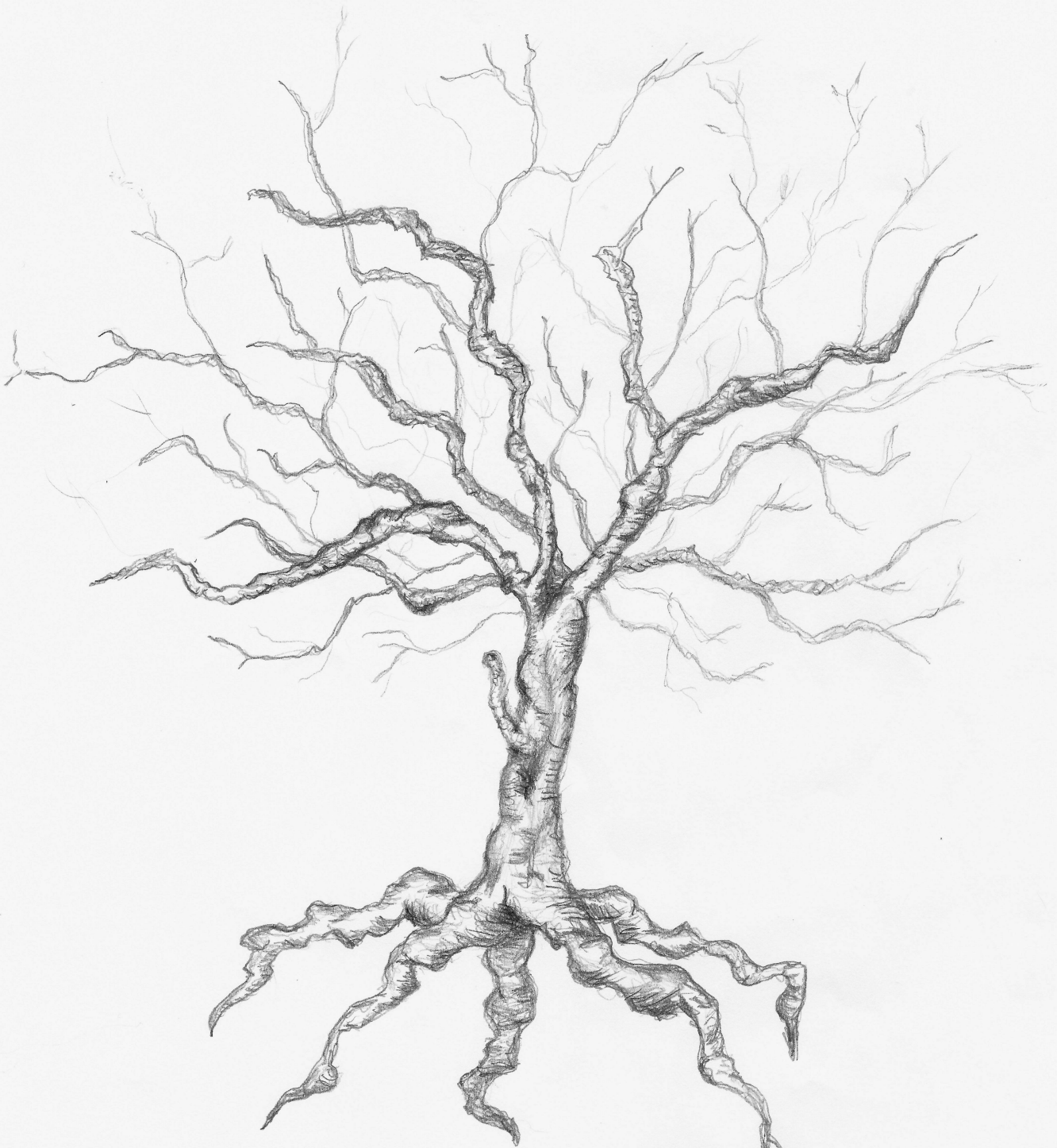
<http://www.tdx.cat/TDX-0907110-134141>

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Els límits i les relacions entre els peixos
Acanthopterygii:
Filogènia molecular de Mugilomorpha i
Atherinomorpha**



Sandra Heras Mena



Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

Els límits i les relacions entre els peixos Acanthopterygii:

Filogènia molecular de Mugilomorpha i Atherinomorpha

Sandra Heras Mena

2010

PROGRAMA DE DOCTORAT DE MEDI AMBIENT

Dirigida per: Dra. María Inés Roldán Borassi

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

MARÍA INÉS ROLDÁN BORASSI, PROFESSORA TITULAR DE GENÈTICA DEL
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSITAT DE GIRONA

CERTIFICA

Que el treball titulat **Els límits i les relacions entre els peixos Acanthopterygii: Filogènia molecular de Mugilomorpha i Atherinomorpha**, presentat per Sandra Heras Mena per a obtenir el grau de Doctora, ha estat realitzat sota la seva direcció al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona, es considera acabat i autoritza la seva presentació al tribunal qualificador.

Girona, 7 de Maig de 2010

María Inés Roldán Borassi

La tesi doctoral s'emmarca dins dels objectius del projecte de recerca titulat Avaluació genètica d'espècies marines amb codi 9103059 finançat per la Universitat de Girona i dirigit per la Dra. M. I. Roldán Borassi. Durant el període de formació pre-doctoral, Sandra Heras Mena ha gaudit d'una beca de recerca d'accions especials de la Universitat de Girona (referència BRAE03/04).

Para ti,

You Get What You Give

AGRAÏMENTS

A tots aquells que m'han recolzat en els moments que més ho he necessitat i també en els moments que no ho he necessitat; als col·legues-amics-o succedanis que m'han suportat els meus malhumors; als companys de feina i d'altres coses miscel·lànies, a totes aquelles persones que m'han ajudat a progressar en el laboratori i en l'anàlisi crítica de les dades; als "jefes", i especialment a la jefa tant pel temps dedicat a mi com a tota la feina que hi ha darrera d'aquesta tesi; als meu pares, shaina, l'estruç, petit i triki que us estimo moooooooolt, a tots vosaltres pel suport incondicional que m'heu regalat: **MERCIIIIIIIIIII!!!!**

La tesi aquí presentada s'estructura amb un compendi de treballs prèviament publicats que consten de les següents referències i índexs de qualitat:

Article I: Heras, S., González Castro, M., Roldán, M.I., **2006.** *Mugil curema* in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach. **Aquaculture 261, 473-478.**

Índex d'impacte de la revista al 2006= **2.081**. Aquesta revista es trobava ubicada en el lloc 7/40 a l'àmbit de Fisheries i 27/86 a l'àmbit de Marine & Freshwater Biology.

Article II: González Castro, M., Heras, S., Cousseau, M.B., Roldán, M.I., **2008.** Assessing species validity of *Mugil platanus* Günther, 1880 in relation to *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Actinopterygii). **Italian Journal of Zoology 75, 319-325.**

Índex d'impacte de la revista al 2008= **0.552**. Aquesta revista es trobava ubicada en el lloc 98/125 a l'àmbit de Zoology.

Article III: Heras, S., Roldán, M.I., González Castro, M., **2009.** Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. **Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 217-231.**

Índex d'impacte de la revista al 2008= **1.792** (encara pendents els valors del 2009, data de la seva publicació). Aquesta revista es troba ubicada en el lloc 7/40 a l'àmbit de Fisheries i 27/87 a l'àmbit de Marine & Freshwater Biology (encara pendents dels valors del 2009, data de la seva publicació).

La suma dels índexs d'impacte de tots els treballs prèviament publicats és de **4.425**.

A més, també s'ha enviat el 23 de Gener per a la seva publicació el següent treball:

Article IV: Heras, S., Roldán, M.I. First phylogenetic inference in *Odontesthes* (Pisces: Acanthopterygii) based on four mitochondrial genes. **Zoological Journal of the Linnean Society (en revisió; codi ZOJ-01-2010-0789).**

Índex d'impacte de la revista al 2008= **2.098**. Aquesta revista es troba ubicada en el lloc 16/125 a l'àmbit de Zoology.

ÍNDEX

Resum	1
Resumen	2
Summary	3
1. Introducció	5
1.1. Taxonomia, classificació i filogènia.....	5
1.2. Marcadors moleculars	15
1.3. Els peixos Acanthopterygii	22
1.3.1. Sèrie Mugilomorpha	24
1.3.2. Sèrie Atherinomorpha.....	42
1.3.3. Relació entre Mugilomorpha i Atherinomorpha	54
1.4. Objectius.....	57
2. Material i Mètodes	59
2.1. Material biològic	59
2.2. Extracció, amplificació i seqüenciació del DNA	62
2.3. Anàlisi de dades.....	66
3. Resultats	71
3.1. Article I:	73
<i>Mugil curema</i> in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach.	
3.2. Article II:	81
Assessing species validity of <i>Mugil platanus</i> Günther, 1880 in relation to <i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758 (Actinopterygii).	
3.3. Article III:.....	91
Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised.	
3.4. Article IV:.....	109
First phylogenetic inference in <i>Odontesthes</i> (Pisces: Acanthopterygii) based on four mitochondrial genes.	
4. Discussió	137
4.1. Filogènia Mugilomorpha.....	143
4.2. Filogènia Atherinomorpha	153
4.3. Filogènia Atherinomorpha-Mugilomorpha	161
5. Conclusions	167
6. Referències	171

RESUM

Sovint, la sistemàtica, basada principalment en caràcters morfològics, no es correspon amb els processos evolutius relacionats amb l'aparició dels grups d'organismes. En l'actualitat, la utilització de les dades moleculars es fa indispensable per a una revisió i millora de la classificació biològica de diversos organismes, com els peixos Acanthopterygii. A la sèrie Mugilomorpha la incongruència entre la taxonomia i la filogènia sorgeix de l'elevada semblança morfològica trobada per part dels seus membres. Pel que fa referència a la sèrie Atherinomorpha, la problemàtica principal resideix en determinar la seva proximitat evolutiva respecte a la sèrie anterior i en establir les relacions filogenètiques dins de la mateixa. Per tant, s'hi ha volgut estimar tant la divergència genètica dins de cada sèrie com inferir les relacions filogenètiques entre ambdues. Per aquest motiu, s'ha realitzat la seqüenciació directa del DNA de les regions mitocondrials corresponents al tRNA-Phe, 12S rRNA, COI, cytb, tRNA-Thr, tRNA-Pro i regió control. En total, s'han estudiat 162 individus morfològicament identificats com a 8 espècies de la sèrie Mugilomorpha i com a 8 espècies de la sèrie Atherinomorpha.

Dins de Mugilomorpha, s'han diagnosticat molecularment individus de *Mugil curema* en zones de nova aparició a més d'establir l'existència de tres tipus genètics o espècies diferents dins d'aquest taxó. A més, els resultats revelen la inconveniència de separar *M. platanus* i *M. liza* en dues espècies diferents. Alhora, formarien part d'un complex d'espècies, juntament amb altres filogrupos de *M. cephalus* distribuïts mundialment i aïllats geogràficament entre sí, que fins ara estaven sota el mateix taxó: *M. cephalus*. El gènere *Mugil* és monofilètic, però *Liza* i *Chelon* s'han de redescrivre sota un mateix gènere. Dins d'Atherinomorpha, s'ha constatat el monofiletisme del gènere *Odontesthes*, sent aquesta la seva primera filogènia molecular realitzada, i el del gènere *Atherina*, en el qual s'han establert les distàncies genètiques del complex d'espècies d'*A. boyeri*, a més de la seva inclusió en els subordres Atherinopsoidei i Atherinoidei respectivament. Per altra banda, ha quedat provada la proximitat de la sèrie Mugilomorpha i la sèrie Atherinomorpha, ambdues monofilètiques.

Aquesta investigació aporta nova informació molecular per tal d'entendre i revisar la història evolutiva dels peixos Acanthopterygii en cerca d'una millora en la seva classificació.

RESUMEN

A menudo, la sistemática, basada principalmente en caracteres morfológicos, no se corresponde con los procesos evolutivos relacionados con la aparición de los grupos de organismos. En la actualidad, la utilización de los datos moleculares se hace indispensable para una revisión y mejora de la clasificación biológica de diversos organismos, como los peces Acanthopterygii. En la serie Mugilomorpha, la incongruencia entre la taxonomía y la filogenia surge de la elevada similitud morfológica encontrada por parte de sus miembros. Por lo que se refiere a la serie Atherinomorpha, la problemática principal reside en determinar su proximidad evolutiva respecto a la serie anterior y en establecer las relaciones filogenéticas dentro de la misma. Por lo tanto, se ha querido estimar tanto la divergencia genética dentro de cada serie como inferir las relaciones filogenéticas entre ambas. Por este motivo, se ha realizado la secuenciación directa del DNA de las regiones mitocondriales correspondientes al tRNA-Phe, 12S rRNA, COI, cytb, tRNA-Thr, tRNA-Pro y región control. En total, se han estudiado 162 individuos morfológicamente identificados como 8 especies de la serie Mugilomorpha y como 8 especies de la serie Atherinomorpha.

Dentro de Mugilomorpha, se han diagnosticado molecularmente individuos de *Mugil curema* en zonas de nueva aparición además de establecer la existencia de tres tipos genéticos o especies diferentes dentro de este taxón. Además, los resultados revelan la inconveniencia de separar *M. platanus* y *M. liza* en dos especies diferentes. A su vez, formarían parte de un complejo de especies, juntamente con otros filogrupos de *M. cephalus* distribuidos mundialmente y aislados geográficamente entre sí, que hasta ahora estaban bajo el mismo taxón: *M. cephalus*. El género *Mugil* es monofilético, pero *Liza* y *Chelon* se deben redescubrir bajo un mismo género. Dentro de Atherinomorpha, se ha constatado el monofiletismo del género *Odontesthes*, siendo ésta su primera filogenia molecular realizada, y el del género *Atherina*, en el que se han establecido las distancias genéticas del complejo de especies *A. boyeri*, además de su inclusión en los subórdenes Atherinopsoidei y Atherinoidei respectivamente. Por otro lado, ha quedado probada la proximidad de la serie Mugilomorpha y la serie Atherinomorpha, ambas monofiléticas.

Esta investigación aporta nueva información molecular para entender y revisar la historia evolutiva de los peces Acanthopterygii en busca de una mejora en su clasificación.

SUMMARY

Often, systematics, based mainly on morphologic characters, does not correspond with the evolutionary processes related to the emergence of the groups of organisms. Nowadays, the utilization of molecular data turns indispensable to a review and improvement of biological classification of several organisms, such as Acanthopterygii fishes. In series Mugilomorpha, the incongruence between taxonomy and phylogeny arises from the high morphological similarity found on the part of its members. Concerning series Atherinomorpha, the main problem lies in determining its evolutionary proximity in relation to series Mugilomorpha and in establishing the phylogenetical relationships inside itself. Therefore, both genetic divergence within each series and phylogenetical relationships between them have been wanted to estimate. For this reason, the direct sequencing of the mitochondrial regions corresponding to tRNA-Phe, 12S rRNA, COI, cytb, tRNA-Thr, tRNA-Pro and control region was achieved. In total, 162 individuals morphologically identified as 8 species from series Mugilomorpha and as 8 species from series Atherinomorpha have been studied.

Within Mugilomorpha, individuals of *Mugil curema* have been molecularly diagnosed at regions of new appearance in addition to establish the existence of three genetic types or different species within this taxon. Moreover, the results reveal the inconvenience of separating *M. platanus* and *M. liza* into two different species. In their turn, they would form part of a species complex, together with other *M. cephalus*' phylogroups worldwide distributed and geographically isolated among them, which were under the same taxon until now: *M. cephalus*. The genus *Mugil* is monophyletic, but *Liza* and *Chelon* must to be redescribed under a same genus. Within Atherinomorpha, the monophyletism of genus *Odontesthes* has been verified, being this one its first molecular phylogeny accomplished, as well as the monophyletism of genus *Atherina*, where the genetic distances of *A. boyeri*'s species complex have been established, in addition to their inclusion in suborders Atherinopsoidei and Atherinoidei respectively. On the other hand, the proximity between series Mugilomorpha and series Atherinomorpha has been proven, being both monophyletic.

This investigation provides new molecular information to understand and to revise the evolutionary history of Acanthopterygii fishes in search of an improvement of its classification.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. TAXONOMIA, CLASSIFICACIÓ I FILOGÈNIA

Des de fa segles les espècies han estat considerades com a les unitats bàsiques i pràctiques per a mesurar la diversitat biològica. Justament, la sistemàtica, del llatí *sistema*, és la ciència que estudia la diversitat dels organismes i les seves relacions mitjançant sistemes de classificació. Alhora, la sistemàtica és una disciplina d'abstracció i de síntesi de conceptes ja que inclou la informació filogenètica, taxonòmica, ecològica o paleontològica establint els criteris d'ordenació dels organismes, els descriu, els anomena i els classifica (Mayr i Ashlock, 1991).

La taxonomia, del grec *taxis*=ordenació i *nomas*=lleï, és una disciplina empírica i descriptiva d'ordenació que forma part de la sistemàtica i que estudia les bases i els principis de classificar i determinar organismes generant-ne hipòtesis explicatives. Descriu i denomina els nous taxa mitjançant la nomenclatura binomial i construeix sistemes d'identificació o determinació per a grups d'organismes (claus taxonòmiques). La determinació és posterior a la classificació ja que ubica a un taxó en una categoria ja

descrita prèviament, dins d'un sistema ja en ús. Quan el taxó no és conegut, se'l classifica, és a dir se'l defineix, denomina i ubica de forma exclusiva en un sistema. Bàsicament, la classificació agrupa espècimens en classes que posseeixen atributs en comú que els uneixen (Mayr i Ashlock, 1991).

Des d'èpoques ancestrals s'han reconegut diferents tipus d'organismes a la natura i s'han anomenat específicament i classificat en sistemes taxonòmics en base al seu grau de similitud. Però el criteri per a definir a una espècie ha anat variant al llarg de la història (Futuyma, 2005). Així, el primer concepte d'espècie del qual es té coneixement és el Concepte essencialista grec segons el qual les espècies eren creades amb una essència única per generació espontània considerant-les entitats inestables i canvians. També era possible qualsevol entrecreuament imaginable entre espècies resultant en éssers amb atributs d'orígens inversemblants sent el màxim exponent el bestiar mitològic (Price, 1996).

A principis del 1700 es desenvolupà el Concepte tipològic linneà. Els naturalistes europeus creien que Déu havia creat les espècies i aquestes eren entitats fixades, immutables. Carolus Linnaeus (1707-1778) va introduir la nomenclatura que utilitzem actualment i va descriure l'ordre natural per descobrir la classificació real. Per aquest motiu, recol·lectà un membre de cada espècie per a preservar-lo en un museu com l'espècimen tipus o holotip per aquesta espècie, va descriure'l (mitjançant claus d'identificació amb caràcters morfològics) i el va anomenar amb una nomenclatura jeràrquica binomial llatina (Price, 1996).

Però no fou fins després de la publicació del llibre "L'Origen de les Espècies" de Charles Darwin al 1859 que la classificació va començar a prendre un sentit totalment diferent. Es va adquirir consciència que les espècies divergeixen, anaven canviant a partir d'un ancestre comú compartit del qual havien heretat trets específics i que aquest fet és el responsable de la similitud morfològica entre les espècies emparentades. Per aquest motiu, actualment la sistemàtica té una base teòrica evolutiva, és a dir, les classificacions ja no reflecteixen una ordenació mística sinó que han d'il·lustrar la història evolutiva real dels organismes amb les extenses connexions heretades entre ancestres i els seus descendents. Així, Darwin va donar el fonament científic per a classificar organismes obrint el camp a la biologia evolutiva (Freeman i Herron, 2004).



Figura 1. Tree of Life Project:
www.tolweb.org/tree/.

Actualment, l'objectiu dels sistemàtics és completar i revisar el gran arbre filogenètic de la vida o *Tree of Life* amb totes les espècies existents i extingides proposat primerament per Darwin i Wallace al 1858. Sabent que probablement existeixen més de 10 milions d'espècies sobre la Terra (Avise, 2006) l'esforç de l'exploració de l'Arbre de la Vida s'ha convertit en un dels principals focus de recerca en la biologia evolutiva i per a la sistemàtica basada en dades moleculars, en particular de DNA. La seva reconstrucció s'ha convertit en un repte inspirant l'origen de la iniciativa *The Tree of Life Web Project* (Figura 1; Maddison i Maddison, 1996). Aquest projecte és el resultat de l'esforç col·laborador de centenars de biòlegs i experts d'arreu del món que estan proporcionant una compilació d'informació de tota la biodiversitat

existent sobre la Terra i de la seva filogènia. No obstant, estimar la filogènia i generar la classificació dels organismes no és exactament el mateix ja que només existeix una única història veritable de la vida sobre la Terra. Com que aquesta no es pot observar de forma directa, s'ha de reconstruir-la inferint-la a partir de les dades disponibles. Així, l'arbre filogenètic és una inferència o hipòtesi, en forma de representació gràfica, d'aquesta història i les evidències de les nostres dades ens guien a acceptar-lo o rebutjar-lo apropant-nos així a la història real de relacions evolutives entre les espècies (Futuyma, 1998).

Derivat d'això, en l'àmbit de la biologia evolutiva, s'han desenvolupat diferents mètodes de reconstrucció per estimar l'Arbre de la Vida i per connectar la filogènia a la sistemàtica donant lloc a diferents corrents de pensament evolutiu al llarg dels últims 50 anys (Price, 1996). Després de les idees de Darwin, es considerà que una classificació s'havia de basar tant en les semblances morfològiques entre els organismes agrupats com en la seva genealogia. Depenent del pes d'aquests dos criteris, de les semblances morfològiques i/o de la genealogia, trobem les diferències més importants entre les tres escoles de classificació biològica (Fontdevila i Moya, 2003).

Fins als 1950 i 1960 els taxònoms, incloent a Darwin i com a principals exponents a J. Huxley, G. Simpson i E. Mayr, pertanyien a l'Escola Tradicional o Evolutiva (Taula 1) que combina tant els criteris genealògics o de parentesc com les dades proporcionades de diferents disciplines com la genètica, la fisiologia, la etologia, etc., per a contrastar-les amb els criteris de semblança morfològica global de la taxonomia tradicional. Té en compte tant els grups monofilètics (inclou l'ancestre comú i a tots els seus descendents) com els parafilètics (inclou l'ancestre comú però no a tots els seus descendents) per ser considerats taxons vàlids i evita els agrupaments polifilètics (es constitueix de la unió artificial de diversos llinatges que no inclouen l'ancestre comú més recent a tots ells) (Fontdevila i Moya, 2003; Freeman i Herron, 2004; Avise, 2006). L'arbre filogenètic d'aquesta corrent taxonòmica es denomina filograma. No només té en consideració les ramificacions de les línies evolutives sinó que alhora reconeix la divergència a posteriori dels seus descendents contemplada en el criteri d'adaptació divergent. D'aquesta manera, es considera que la diferència morfològica extrema d'un llinatge respecte als altres es basa en caràcters que

representen adaptacions evolutives importants com a conseqüència de la conquesta d'un nou ambient o nínxol (Price, 1996).

Als anys 60 sorgí l'Escola Fenètica (Taula 1), també coneguda com a Taxonomia Numèrica, que fou especialment desenvolupada per Sokal i Rohlf (1962) i Sokal i Sneath (1963). L'Escola Fenètica treballa amb el major nombre de caràcters possibles per tal d'evitar que la tria dels mateixos pogués ser realitzada de forma arbitrària i subjectiva en funció de l'investigador que dugui a terme un estudi determinat. No obstant, aquest criteri dóna el mateix pes a tots els caràcters emprats, la qual cosa fa que aquesta escola de classificació fos criticada per aquest fet (Price, 1996). Principalment, la disciplina fenètica dóna prioritat a les semblances entre els organismes a classificar, quantificant-les i tractant-les matemàticament. El diagrama il·lustratiu de l'Escola Fenètica és el fenograma que reconeix la semblança fenotípica d'un grup d'espècies. Des de la seva fundació, aquesta escola ha anat millorant i avançant en les metodologies morfomètriques tradicionals (descripció i anàlisi quantitativa de la variació de la forma) que usualment només abastaven l'anàlisi estadístic multivariant de les distàncies lineals com la llargada o amplada d'un individu. Una de les millores introduïdes per Strauss i Bookstein al 1982 fou l'aplicació del mètode *box-truss* (protocol geomètric per a la selecció de caràcters) basat en *landmarks* (punts de referència biològicament informatius, reconeixibles i equivalents entre espècimens diferents) que feia més efectiva i comprensiva la descripció i representació d'una forma. Posteriorment, es normalitzen (Lombarte i Lleonart, 1993; Ibáñez-Aguirre i Lleonart, 1996; Lleonart et al., 2000) les variables obtingudes dels espècimens de diferents talles per tal d'escalar i corregir l'alometria (variació de la forma relacionada amb la variació en la mida) i aquestes variables corregides s'utilitzen en una anàlisi multivariant com per exemple de components principals (PCA). No obstant, aquestes distàncies *truss* no mantenen la geometria relativa de les coordenades d'aquests punts homòlegs. És amb l'aparició a finals dels 80 i principis dels 90 (Rohlf, 1990; Rohlf i Marcus, 1993) del concepte de Morfometria Geomètrica (MG) amb el que s'aconsegueix mantenir la informació geomètrica en 2D o 3D de les estructures morfològiques al llarg de tota l'anàlisi. Aquest concepte engloba dues grans línies de treball: 1) Mètodes basats en *landmarks* i 2) Mètodes basats en contorns o *outlines*.

- 1) La geometria es captura mitjançant el registre respecte algun eix de les coordenades Cartesianes dels *landmarks* o en el seu defecte de *pseudolandmarks* (punts relativament localitzats, ex. punt més distal d'una estructura). S'observa com certes estructures s'han desplaçat respecte a unes altres mitjançant diferents funcions (ex. *Thin-plate spline* que és una funció de deformació) que expressin les diferències de les configuracions de les coordenades dels *landmarks*. El tres tipus principals d'anàlisi són de *warps* o deformació, de coordenades de Bookstein i de superimposició. Aquests mètodes permeten quantificar els canvis d'una forma respecte a una altra observant quant es desvia d'una forma consens o mitjana, determinant així el grau de major o menor pes o variabilitat de cadascun d'aquests *landmarks*. Finalment, els paràmetres que descriuen aquestes deformacions poden ser representats en una PCA.
- 2) Quan hi ha pocs *landmarks* disponibles en l'estructura d'interès, s'utilitzen els contorns de les mateixes. Aquest foren els primers mètodes descrits en la MG. Es registren una seqüència de coordenades corresponents als punts al llarg d'un contorn i s'encaixen en una funció matemàtica. Els mètodes més utilitzats són els d'anàlisi de Fourier (Rohlf i Archie, 1984; Adams et al., 2004). Aproximacions posteriors defineixen un set de formes rectangulars estàndards per a comparar les formes (Rosin, 1999). Finalment, una alternativa a aquestes anàlisis són els *wavelet* (ona petita i de duració finita que difereix de la de Fourier en la seva periodicitat) que permeten millorar en la discriminació de determinades singularitats localitzades d'una estructura en particular permetent, així, focalitzar-se amb més detall (Lestrel, 2000; Parisi-Baradad et al., 2005). No obstant, a aquests mètodes els hi manca la informació homòloga provinent dels *landmarks*. Per aquest motiu, actualment s'estan desenvolupant mètodes que permetin integrar aquestes dues grans línies de MG (Adams et al., 2004).

Malgrat tot, la similitud morfològica entre els organismes que formen part d'un grup creat mitjançant la classificació fenètica no sempre ens indica que aquests organismes comparteixin un avantpassat recent en comú representant així un caràcter homòleg, en sentit evolutivament estricte, compartit entre ells, ja que aquesta semblança entre aquest grup d'organismes es podria haver originat per paral·lelisme o convergència evolutiva. Aquesta circumstància implica així l'acceptació per part

d'aquesta classificació biològica tant de grups monofilètics, parafilètics com polifilètics (Taula 1; Fontdevila i Moya, 2003).

Casi simultàniament amb l'Escola Fenètica va sorgir l'Escola Cladista (Taula 1) que, juntament amb l'Escola Evolutiva, és la que més seguidors presenta avui dia i fou bàsicament desenvolupada per Willi Hennig (1950). Aquesta corrent emfatitza i es basa exclusivament en les relacions de parentesc o genealogia de les reconstruccions filogenètiques per la qual cosa se la coneix també com Escola Filogenètica (Wiley, 1981). El seu arbre evolutiu és el cladograma que és l'arbre amb menys canvis evolutius possibles ja que aquests són més probables sota el principi de la parsimònia. Per tant, l'aspecte fonamental d'aquesta escola és l'anàlisi detallada del valor evolutiu de tots els caràcters separant-los en homologies (similitud dels caràcters entre els organismes resultat d'un origen recent comú) i homoplàxies o analogies (similitud dels caràcters resultat d'una evolució convergent o paral·lela sense ancestre recent comú) (Avisé, 2006). Els caràcters homòlegs, alhora, es diferencien en ancestrals (plesiomòrfics) i derivats (apomòrfics) utilitzant una polarització dels mateixos gràcies a grups externs als estudiats (*outgroup*). Només els caràcters derivats compartits per dos o més taxons (sinapomorfies) són els tinguts en compte a l'hora de realitzar les reconstruccions filogenètiques. En conseqüència, només els grups monofilètics basats en les homologies derivades (Taula 1) es convertiran en taxons i es rebutgen els grups parafilètics i polifilètics considerant-los com a taxa no vàlids (Price, 1996; Fontdevila i Moya, 2003; Futuyma, 2005).

Taula 1. Criteris per a distingir entre les escoles de classificació: evolutiva, fenètica i cladista (Fontdevila i Moya, 2003).

Escola	Caràcters				Grup acceptat		
	Tipus de Caràcter	Analogia	Homologia		Monofilètic	Parafilètic	Polifilètic
			Ancestral	Derivada			
Evolutiva	Escollit	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Fenètica	Qualsevol	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Cladista	Escollit	No	No	Sí	Sí	No	No

Cadascuna de les escoles de classificació biològica descrites anteriorment ha contribuït al progrés de la sistemàtica, ja que actualment la suma de metodologies ofereix una elevada robustesa a la classificació biològica. Però la unitat operativa d'una classificació és l'espècie la qual no ha estat encara definida satisfactòriament ja que aquest terme s'adapta a l'àmbit de treball al qual s'estigui aplicant en aquell moment. Amb el que estan d'acord totes les definicions d'espècie existents és de la independència evolutiva entre espècies diferents (Freeman i Herron, 2004). La valoració d'aquesta independència és la que es basa en la manca de flux gènic, la qual és difícil de testar en molts organismes tant vius com extints. Aquest fet es veu reflectit en els diferents conceptes d'espècie existents avui dia dels quals se n'han exposat alguns d'ells a la Taula 2.

Taula 2. Exemples de conceptes d'espècie segons Avise, 1994; Price, 1996; Coyne i Orr, 2004; Futuyma, 2005 (*són els 2 conceptes més utilitzats).

Concepte biològic *	<p>1) Les espècies són sistemes de poblacions: l'intercanvi gènic entre aquests sistemes és limitat o previngut per un mecanisme d'aïllament reproductiu o potser per una combinació de varis d'aquests mecanismes (Dobzhansky, 1937 modificat de Dobzhansky, 1935).</p> <p>2) Les espècies són un grup de poblacions, actualment o potencialment, naturalment entrecreuables que es troben reproductivament aïllades d'altres grups similars [inclou el concepte no-dimensional (poblacions que comparteixen un mateix espai i temps, Mayr 1963) i el concepte multidimensional (ahora també considera poblacions de localitats separades i actives en diferents temps, Mayr, 1963)] (modificat de Mayr, 1942).</p>
Concepte filogenètic *	<p>1) Una espècie és un cluster irreductible (basal) d'organismes que és diagnòsticament diferent d'altres clusters, i dins del qual hi ha un patró parental d'ancestre i descendent (Cracraft, 1989 basat en Cracraft, 1983).</p> <p>2) Una espècie és el grup monofilètic més petit (exclusiu) amb un ancestre comú (de Queiroz i Donoghue, 1990).</p>
Concepte genealògic	<p>Les espècies són grups "exclusius" d'organismes a on els membres dels quals estan tots més estretament relacionats els uns amb els altres que amb qualsevol organisme de fora del grup (Baum i Shaw, 1995).</p>
Concepte evolutiu	<p>L'espècie és un llinatge (una seqüència d'ancestre-descendent) de poblacions d'organismes que manté una identitat separada d'altres llinatges i la qual té la seva pròpia tendència evolutiva i destí històric (Wiley, 1978 modificat de Simpson, 1961; Simpson, 1951; Grant, 1971)</p>
Concepte de reconeixement	<p>Una espècie és la població més inclusiva d'organismes individuals biparentals que comparteixen un sistema de fertilització comú (Paterson, 1985).</p>
Concepte cohesiu	<p>Una espècie és la població més inclusiva d'individus que tenen la potencialitat per a una cohesió fenotípica a través de mecanismes intrínsecs de cohesió (Templeton, 1989).</p>

Així, tal i com diu J. Hey (2001) en referència als diferents conceptes d'espècie, el dilema sorgeix del fet que la paraula espècie és d'ús habitual i comú pels investigadors, però, en canvi, el seu significat o definició no ho és provocant un conflicte entre els diferents sentits o accepcions de la mateixa.

1.2. MARCADORS MOLECULARS

A la segona meitat del segle XX els científics es van bolcar en l'examinació física dels gens descobrint-se'n la composició de DNA (Avery et al., 1944), amb l'estructuració molecular en doble hèlix (Watson i Crick, 1953), i el seu codi genètic (Khorana et al., 1966; Nirenberg et al., 1966). Un fet que resulta crucial és la innovació i el desenvolupament tecnològic que han impulsat l'avenç en la ciència en general i en l'anàlisi genètica en particular. Als anys 70 s'aconsegueix seqüenciar fragments de DNA mitjançant el mètode químic (Maxam i Gilbert, 1977) i el mètode didesoxi o de terminació de cadena (Sanger i Coulson, 1975). La seqüenciació automàtica del DNA (Smith et al., 1986) va ser plenament desenvolupada per Applied Biosystems basant-se en la metodologia anterior i va ser introduïda al mercat al 1986 amb la comercialització del primer seqüenciador automàtic 370A (Applied Biosystems, 2009; www.appliedbiosystems.com). Una altra gran empenta en l'avenç en els estudis amb base genètica la proporcionà al 1983 Kary Mullis que va desenvolupar la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), posteriorment descrita al 1985 (Saiki et al., 1985), que permetia replicar molècules de DNA in vitro a partir de fragments insignificants de mostra, de forma ràpida i fàcil, utilitzant l'enzim polimerasa. L'automatització d'aquesta reacció es va produir gràcies a l'aparició dels termocicladors al 1986 que permetien regular la temperatura dels cicles de la PCR sent *The Perkin-Elmer/Cetus DNA Thermal Cycler 480* el primer aparell que es va comercialitzar (Daniell, 1999). Des de la seva aparició, han sigut perfeccionats augmentant la seva precisió en els perfils de temperatura i en la capacitat de mostres per analitzar. Per tant, amb els avenços metodològics en la tècnica de seqüenciació del DNA i en la PCR, s'ha aconseguit optimitzar l'obtenció i lectura en relativament poc temps de les seqüències de DNA. D'aquesta forma, els científics han pogut utilitzar rutinàriament la informació genètica per aplicar-la en la ciència forense, estudis poblacionals, de flux gènic, d'especiació, de filogènia, estudis evolutius i de sistemàtica (Avise, 1994). Així, s'ha aconseguit promoure la creació del projecte genoma humà al 1990 (www.genomics.energy.gov/) i, alhora també, revolucionar la filogènia fins ara coneguda de l'Arbre de la Vida. Aquesta filogènia s'ha anat reconstruint gràcies als caràcters heretats o transmesos genèticament. Així, idealment, un marcador molecular o

genètic és un fragment de DNA que marca la posició d'un gen particular (Futuyma, 2005; Avise, 2006), amb herència coneguda d'una característica concreta (Strickberger, 2000; Avise, 1994) i presenta suficient variabilitat per poder realitzar estudis de diversitat intraespecífica o interespecífica (Hillis et al., 1996a). El fet d'utilitzar caràcters moleculars en comptes dels caràcters morfològics per inferir les relacions evolutives té els seus avantatges i inconvenients. L'ús dels caràcters morfològics és l'única aproximació possible en el cas dels fòssils o dels exemplars conservats als museus en formol, ja que la majoria de tècniques moleculars requereixen de mostres fresques o conservades en alcohol (Freeman i Herron, 2004). No obstant, és difícil de saber si els caràcters morfològics escollits són evolutivament independents o com influencien els factors ambientals en la variabilitat no heretable dels mateixos. A més, existeixen pocs trets morfològics compartits entre els grans grups d'organismes per a poder-ne'n realitzar una comparació a gran escala (Freeman i Herron, 2004).

Els caràcters moleculars provinents de les seqüències del DNA, en canvi, presenten una codificació més exacta, amb només quatre alternatives possibles: A (Adenina), C (Citosina), T (Timina) i G (Guanina); en comparació a quan s'utilitzen caràcters morfològics continus. Per tant, els caràcters moleculars basats en les seqüències de DNA permeten construir una filogènia més acurada a l'hora de resoldre conflictes en l'evolució d'organismes estretament relacionats, que els mètodes tradicionals no han aconseguit resoldre, i resultant imprescindible quan la variabilitat morfològica és escassa (Moritz i Hillis, 1996). Tot i que la seqüenciació directa del DNA és més cara que la morfològica i requereix el seu temps per posar a punt la seva optimització en l'estudi de la sistemàtica, la seva necessitat s'ha vist reconeguda per part dels biòlegs interessats en introduir noves tècniques (Avise, 1994; Freeman i Herron, 2004) esdevenint una de les aproximacions moleculars més utilitzades per inferir la història filogenètica (Hillis et al., 1996a) tal i com es veu reflectit a la Taula 3.

Taula 3. Aplicació de diverses tècniques moleculars a problemes de la sistemàtica (Hillis et al., 1996b).

	Isozims	Citogenètica	Hibridació DNA-DNA	Anàlisi restricció	Anàlisi fragments*	Seqüenciació DNA/RNA
Evolució dels gens	M	M	–	M	–, M, –	+
Subdivisió poblacional	+	M	–	+	M, +, –	+
Variació geogràfica	+	M	–	+	M, +, M	+
Hibridació	+	+	–	+	+, M, –	€
Límits d'espècie	+	+	–	+	+, M, –	+
Filogènia (0-5 mya)	+	M	M	+	–, M, –	+
Filogènia (5-50 mya)	+	M	+	+	–, –, –	+
Filogènia (50-500 mya)	M	M	M	M	–, –, –	+
Filogènia (500-350 mya)	–	–	–	–	–, –, –	+

Nomenclatura

–: ús inapropiat de la tècnica.

M: ús marginalment apropiat o apropiat sota circumstàncies limitades.

€: ús apropiat de la tècnica, però impracticable per ser costosa.

+: mètode apropiat i efectiu.

* Les anàlisis de fragments inclouen recomanacions per RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), mini o microsatèl·lits i multilocus DNA fingerprinting respectivament.

Un cop estesa l'acceptació i utilització de les dades derivades de la seqüenciació directa de DNA, la comunitat científica es va veure en la necessitat d'elaborar models matemàtics que expressen com els caràcters nucleotídics van canviant al llarg del temps (Figura 2). En funció de com són calculades les probabilitats dels canvis i de les assumpcions d'aquests processos de canvi trobem diferents tipus de models d'evolució molecular de les seqüències de DNA exemplificats a la Taula 4 i Figura 3.

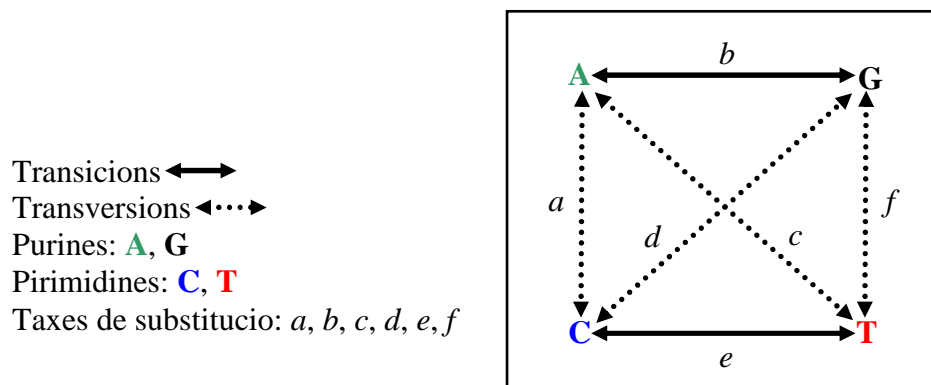


Figura 2. Esquema dels tipus de canvis (transicions o transversions) entre les diferents bases nucleotídiques (purines o pirimidines).

Taula 4. Grau de parametrització dels models de substitució nucleotídica (Posada i Crandall, 1998; Thollesson, 2001). Nomenclatura de les taxes de substitució en funció de la Figura 2.

Models	Taxes de substitució	Freqüència de bases	Referència
JC	a=b=c=d=e=f	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Jukes i Cantor, 1969
K2P, K80	a=c=d=f, b=e	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Kimura, 1980
TrNef	a=c=d=f, b, e	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Tamura i Nei, 1993
K81, K3ST	a=f, b=e, c=d	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Kimura, 1981
TVMef	a, c, d, f, b=e	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Tavaré, 1986
TiMef	a=f, c=d, b, e	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Tavaré, 1986
SYM	a, b, c, d, e, f	$\pi A=\pi C=\pi G=\pi T$	Zharkikh, 1994
F81	a=b=c=d=e=f	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Felsenstein, 1981
HKY85	a=c=d=f, b=e	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Hasegawa et al., 1985
F84	a=c=d=f, b=e	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Felsenstein, 1984
TrN	a=c=d=f, b, e	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Tamura i Nei, 1993
K81uf	a=f, b=e, c=d	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Kimura, 1981
TVM	a, c, d, f, b=e	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Tavaré, 1986 Transversional
TiM	a=f, c=d, b, e	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Tavaré, 1986 Transicional
GTR	a, b, c, d, e, f	$\pi A, \pi C, \pi G, \pi T$	Lanave et al., 1984

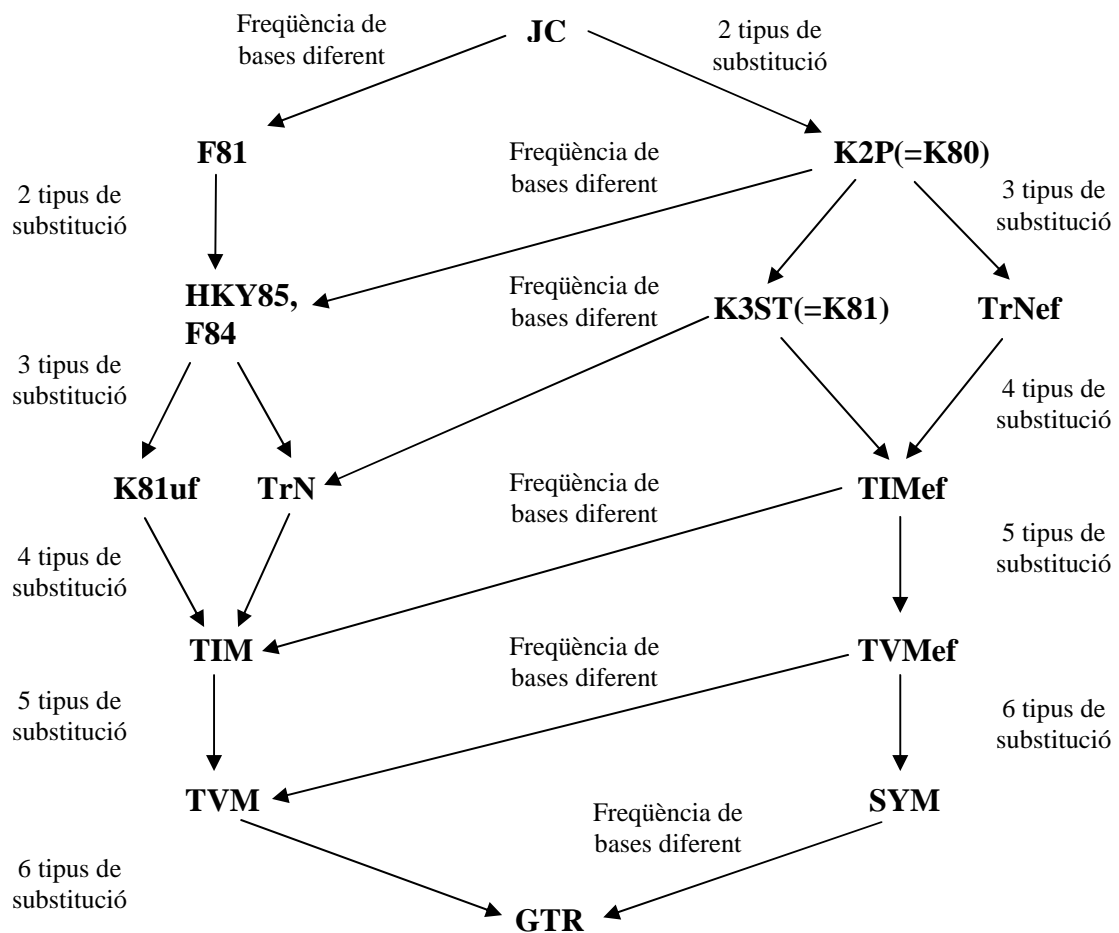


Figura 3. Relació entre els models de substitució del DNA basat en Thollesson (2001).

Un dels passos crucials és l'elecció de la molècula a seqüenciar depenent del propòsit de l'estudi (Hillis et al., 1996a). Una de les qüestions que sorgeix és si l'arbre del gen estudiat reflecteix la filogènia dels organismes a través dels quals s'ha transmès aquest gen. Habitualment, no concordarien quan hi ha hagut retenció de polimorfismes ancestrals o processos de reticulació entre poblacions (flux gènic) o espècies (hibridació). Per assegurar una congruència entre els arbres dels gens i la filogènia dels organismes l'atenció s'acostuma a confinar als fragments de DNA que tinguin un baix nivell o cap grau de recombinació com seria el cas del DNA mitocondrial (mtDNA) (Avice, 1994) representat a la Figura 4. A la pràctica, el mtDNA ofereix una de les millors oportunitats per aplicar la seqüenciació de DNA per testar hipòtesis filogeogràfiques a on les taxes de migració són baixes (Moritz i Hillis, 1996), per estudis poblacionals, de diversitat intraespecífica i de diversitat interespecífica (Hillis et al., 1996a). Gràcies a la seva utilització, el mtDNA ha esdevingut una de les molècules més conegudes actualment ja que s'hi troben marcadors àmpliament utilitzats exitosament pel món científic durant els últims anys. Aquesta molècula acostuma a presentar (exceptuant alguns casos concrets) les següents característiques en els organismes animals que l'han convertit d'ús habitual en l'àmbit dels estudis de sistemàtica molecular (Avice, 1994):

- Molècula circular tancada de doble cadena; una de pesada o H (*heavy*) i l'altre de lleugera o L (*light*).
- Entre 15.000-20.000 parells de bases (pb) de longitud.
- Es divideix en 37 gens, corresponents 22 tRNA, 2 rRNA i 13 mRNA, i en una regió de control (RC) que és on s'inicia la replicació i la transcripció.
- Biaix positiu de transicions respecte a transversions.
- Poliplàsmia: n'existeixen moltes còpies per cèl·lula, la qual cosa fa que es recorri a aquesta molècula quan el DNA nuclear és escàs com per realitzar estudis forensics.
- Homoplàsmia: única línia o seqüència de mtDNA present en totes les cèl·lules d'un mateix individu.
- Té herència materna, per tant, no presenta recombinació, a diferència del DNA nuclear, i al seu genotip també se'l denomina haplotip.

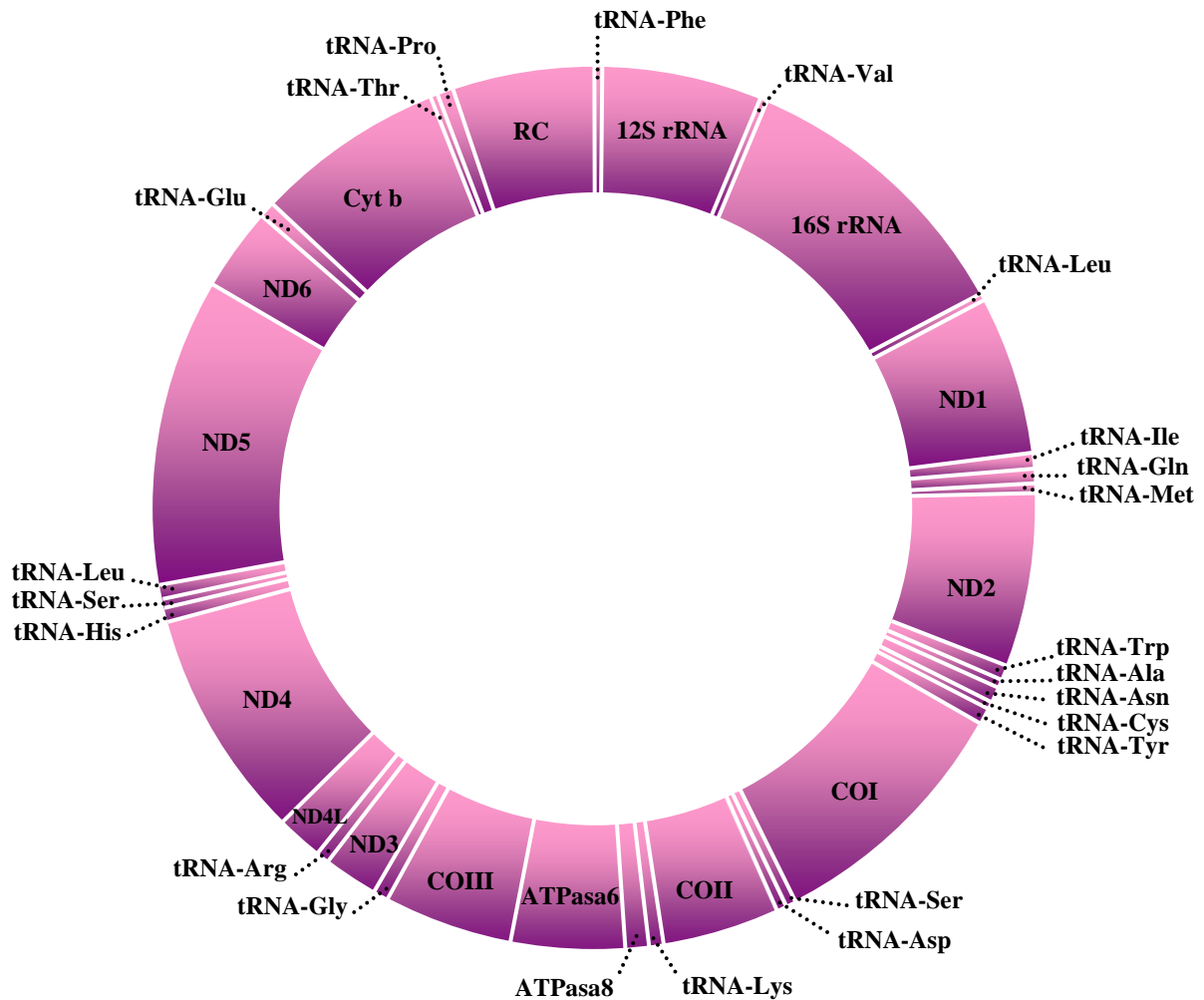


Figura 4. DNA mitocondrial de *Mugil cephalus* basat en Miya et al. (2001).

Un altre punt important és el disseny de *primers* o encebadors destinats a l'amplificació dels diversos marcadors mitocondrials. Fa anys que existeix un grup de *primers* universals per a les regions més àmpliament usades. No obstant, ocasionalment cal adaptar-los a les espècies sota estudi o redissenyar-los. Així, les regions del mtDNA seqüenciades habitualment són aquelles que codifiquen per subunitats d'RNA ribosomal, com per exemple el 12S rRNA, i per citocroms com la citocrom b (cytb) i la citocrom c oxidasa subunitat I (COI). Fins i tot, al 2004, arran de la proposta de Hebert et al. (2003) es va crear *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL: www.barcoding.si.edu/Event_May2004Meeting.htm) que proposa la identificació de les espècies emprant la COI com a marcador. Aquest consorci ha fomentat (Ratnasingham i Hebert, 2007) la recerca internacional per a construir una genoteca formada pels codis de barres de tota la vida eucariota, *The Barcode of Life Data System* (BOLD:

www.barcodinglife.org), i val a dir que una de les seves iniciatives està dedicada exclusivament als peixos, *The Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL: www.fishbol.org), fent especial èmfasi en les espècies marines.

Actualment, l'ús de les eines moleculars ha representat una revolució en la reconstrucció de la filogènia en tots els nivells d'organització de la vida. No obstant, la utilització dels caràcters morfològics no pot ser abandonada. L'addició de les dades moleculars recolzarà o rebutjarà la filogènia construïda primerament amb dades morfològiques. Per aquest motiu, poden recolzar-se mútuament quan existeixen similituds entre ambdós tipus de dades (Futuyma, 2005). Molts investigadors consideren que els estudis que incorporen les dues aproximacions proporcionen una visió del seu contingut més informativa i estable permetent-ne una major utilitat, descripció i interpretació de la diversitat biològica (Moritz i Hillis, 1996; Maddison, 1996).

1.3. ELS PEIXOS ACANTHOPTERYGII

Els peixos Acanthopterygii (divisió Teleostei), caracteritzats per tenir a les aletes radis endurits semblants a espines i una mandíbula superior més mòbil que altres peixos, consten de 13 ordres, 267 famílies i 14797 espècies que es classifiquen en 3 sèries anomenades Mugilomorpha (72 espècies), Atherinomorpha (1.552 espècies) i Percomorpha (13.173 espècies) (Taula 5).

Taula 5. Classificació segons Nelson (2006) incloent a tots els ordres d'Acanthopterygii. * Sèries en les que principalment s'ha centrat el present estudi.

Sèrie Mugilomorpha *

Ordre Mugiliformes



Sèrie Atherinomorpha *

Ordre Atheriniformes

Ordre Beloniformes

Ordre Cyprinodontiformes



Sèrie Percomorpha

Ordre Sthephanoberyciformes

Ordre Beryciformes

Ordre Zeiformes

Ordre Gasterosteiformes

Ordre Synbranchiformes

Ordre Scorpaeniformes

Ordre Perciformes

Ordre Pleuronectiformes

Ordre Tetraodontiformes



Existeixen multitud de controvèrsies entre la taxonomia i les relacions filogenètiques dels peixos Acanthopterygii conseqüència de la manca d'eficàcia dels caràcters morfològics. Aquests caràcters han resultat poc resolutius ja que no han aconseguit reflectir la història evolutiva d'aquests peixos de forma minuciosa. És precisament aquesta controvèrsia la que ha motivat aquest treball. Donat que des d'un principi hem sigut conscients que incloure'ls a tots era una tasca impossible de realitzar

durant el desenvolupament d'una tesi doctoral (del total de 27.977 espècies de peixos reconegudes, més de la meitat pertanyen als Acanthopterygii), ens hem centrat en la sèrie Mugilomorpha (ordre Mugiliformes), en la sèrie Atherinomorpha (concretament en l'ordre Atheriniformes) i en la relació entre ambdues sèries, deixant per a una altra etapa laboral els aspectes particulars d'altres ordres.

1.3.1. SÈRIE MUGILOMORPHA

L'**Ordre Mugiliformes** és l'únic representant de la sèrie Mugilomorpha i consta d'una única família:

Família Mugilidae

Els membres de la família Mugilidae són coneguts com a llisses o mugílids i consten de 17 gèneres, *Agonostomus*, *Aldrichetta*, *Cestraeus*, *Chaenomugil*, *Chelon*, *Crenimugil*, *Joturus*, *Liza*, *Mugil*, *Myxus*, *Neomyxus*, *Oedalechilus*, *Plicomugil*, *Rhinomugil*, *Sicamugil*, *Valamugil*, i *Xenomugil*, amb 72 espècies (Nelson, 2006). La majoria d'espècies són eurihalines i detritívores (iliòfagues) que habiten ambients marins costaners tropicals i temperats d'arreu del món, d'aigües salobres, estuaris i alguns d'aigua dolça (*Liza abu* és exclusivament d'aigua dolça i estuaris). Tenen una remarcable uniformitat en les formes externes i també en l'anatomia interna, per contra, la principal diversificació evolutiva ha succeït en la boca i en la seva anatomia associada (Nelson, 2006).

Trets generals de la família: 24-26 vèrtebres, 1.2 m de llargada estàndard màxima, 2 aletes dorsals àmpliament separades (l'anterior amb 4 espines i la posterior amb 1 espina i 8-10 radis tous), aleta anal amb 2 o 3 espines i 7-11 radis tous, aletes pectorals elevades en el cos, aleta pèlvica subabdominal, amb una espina i 5 radis tous embrancats. Línia lateral absent o molt tènue. Escates ctenoides ó tipus raspall en adults excepte *Myxus*, el qual les té cicloides ó arrodonides al llarg de tota la vida. Boca moderada en mida amb dents petites o absents. Les espines branquials són llargues. L'estómac habitualment muscular i intestí excessivament llarg. El mecanisme de filtració de menjar oral i branquial involucra les espines branquials i l'aparell faríngic (Nelson, 2006). Viatgen en bancs i s'alimenten remenant les superfícies submergides i filtrant una gran quantitat de detritus bentònic, ingerint algues fines, petits invertebrats, microorganismes i material orgànic dels sediments. Les espècies costaneres usualment fresen mar endins i les espècies d'aigua dolça fresen en aigües salobres. Són importants en l'alimentació humana i en alguns països per la seva pesqueria a petita escala. A més, la simple dieta i el ràpid creixement de les llisses ha fet que algunes espècies siguin objecte de l'aqüicultura (Harrison, 2002).

Caràcters diagnòstic: A part dels atributs utilitzats de forma comú com el recompte d'escates, les espines o els radis i la mesura de les proporcions del cos, els trets de valor diagnòstic inclouen la forma de les espines branquials, la forma del preorbital, la longitud relativa del parell d'aletes i de les seves escates axil·lars, la presència o absència de la parpella adiposa i el grau de la seva intrusió sobre l'ull, així com el nombre de caeca pilòriques i de la longitud relativa de l'intestí.

Problemàtica:

Les espècies de la família Mugilidae presenten una elevada semblança morfològica entre elles que provoca una classificació molt complicada utilitzant la morfologia clàssica (Menezes, 1983; Gilbert, 1993; Thomson, 1997). Aquest fet, sumat a la informació de les primeres dades moleculars (Crosetti et al., 1994; Caldara et al., 1996; Rossi et al., 1998a, b, 2004; Rocha-Olivares et al., 2000; Papatropoulos et al., 2001, 2002; Nirchio et al., 2003; Turan et al., 2005), condueix a un conflicte manifest entre la filogènia molecular i la taxonomia d'aquests peixos sobretot pel que fa referència als taxons dins del gènere *Mugil* i de les relacions entre *Liza* i *Chelon*.

El gènere *Mugil* es distribueix arreu excepte al Mar Àrtic i Antàrtic i, segons Thomson (1997), consta de 12 espècies. Aquest gènere es caracteritza per un maxil·lar prim visible per sobre del premaxil·lar, presència de parpella adiposa, l'escata axil·lar punxeguda, marge prim del llavi inferior i absència d'espina opercular.

Espècies del gènere *Mugil* estudiades:

Mugil cephalus Linnaeus, 1758

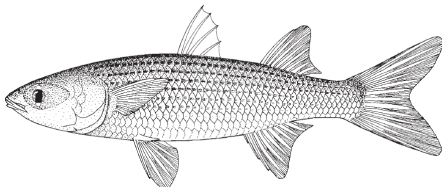


Foto extreta de Harrison (2002).

Mugil cephalus, també coneguda com a llissa grisa, llissa llobarrera o cabessut, és l'espècie més coneguda i principal representant de la família Mugilidae (Thomson, 1997; Harrison, 2002; FAO, 2009). Cap espècimen típic ha sobreviscut a la col·lecció de Linnaeus, però existeix un reconeixement general que el *M. cephalus* de

Linnaeus és un compendi d'almenys 3 espècies de mugílids europeus sense determinar (Thomson, 1997).

Caràcters diagnòstic: *M. cephalus* pot assolir una mida màxima de 120 cm de llargada estàndard, tot i que és més comú trobar-les de 35-50 cm. Cos cilíndric i robust. Cap ample i amb llargada igual o més gran que la seva amplada. Parpella adiposa desenvolupada cobrint la major part de la pupila. Llavi superior prim amb una filera externa de dents molt petites unicúspides i d'1-6 fileres internes de dents bicúspides. Espines branquials llargues. 2 aletes dorsals fosques, la primera amb 4 espines, la segona amb 8-9 radis tous. Aleta anal pàl·lida amb 3 espines i 8 radis tous. Aletes pectorals fosques amb 16-19 radis i amb una taca fosca en l'origen. Aletes pèlviques pàl·lides i aleta caudal fosca i fortament bifurcada. 2 caeca pilòriques. El color dels espècimens marins és gris oliva o gris marró en vista dorsal, flancs platejats, l'abdomen blanquinós i al voltant de 7-10 estries longitudinals fosques al llarg dels flancs, seguint les fileres d'escates. Els espècimens d'estuari són més blavosos o d'un marró brut en vista dorsal i els flancs són d'un color apagat (FAO, 2009).

Biologia: Pot viure a temperatures de 8-24°C en aigües marines en calma properes a la costa, desembocadures de recs i cales, badies salobres i llacunes, rius i ports. Els adults poden tolerar salinitats de 0-75‰ mentre que els juvenils només poden tolerar aquest ampli rang quan assolixen llargades de 4-7 cm.



Foto extreta de www.daveharasti.com/nelsonbay/fish/Mugil_cephalus.jpg

Els adults formen bancs enormes prop de la superfície de sorra o fons fangosos i de densa vegetació. És principalment diürn i té un llarg tracte intestinal que li permet alimentar-se de detritus orgànic, zooplàncton i organismes bentònics succionant la capa superficial dels sediments. Migren mar endins per fresar i les larves es mouen cap a la costa, cap a aigües poc profundes, per protegir-se dels predadors; un cop arriben a 5 cm es mouen cap a aigües més profundes (Harrison, 2002).

Distribució: A causa de les seves característiques que li permeten suportar temperatures elevades, salinitats variables i certs nivells de contaminació orgànica, és una espècie cosmopolita d'àmplia distribució i comú en aigües costaneres tropicals, subtropicals i temperades d'arreu del món (51°N-42°S) (Figura 5). Usualment, s'indica com a absent a Bahames, Antilles, i costes caribenyes de centre Amèrica i Colòmbia (Harrison, 2002). A l'Atlàntic oriental es distribueix des de la Bahia de Biscaia a França fins a Sud-àfrica incloent tot el Mediterrani i Mar Negre i introduït al Mar Caspi. Al Pacífic oriental, el rang inclou Califòrnia fins a Xile, a l'oest del Pacífic des de Japó a Austràlia i en l'oceà Índic occidental des de l'Índia fins a Sud-àfrica. No obstant, la distribució de *M. cephalus* a l'Atlàntic occidental roman sense resoldre ja que segons la FAO (2009) i Thomson (1997) s'inclou des de Nova Escòcia, incloent el Golf de Mèxic, fins a Argentina (Figura 5). Tanmateix, Gilbert (1993) va posar en dubte d'incloure'l en aigües tan meridionals perquè considerà que *M. cephalus* s'hauria de trobar restringida a les aigües continentals d'Estats Units i de Mèxic. A més, ictiòlegs locals com Menezes (1983) i Cousseau et al. (2005) indiquen la presència d'una altra espècie del gènere *Mugil*, concretament *Mugil platanus*, des del sud de Brasil fins a Argentina en comptes de *M. cephalus* (?; Figura 5).

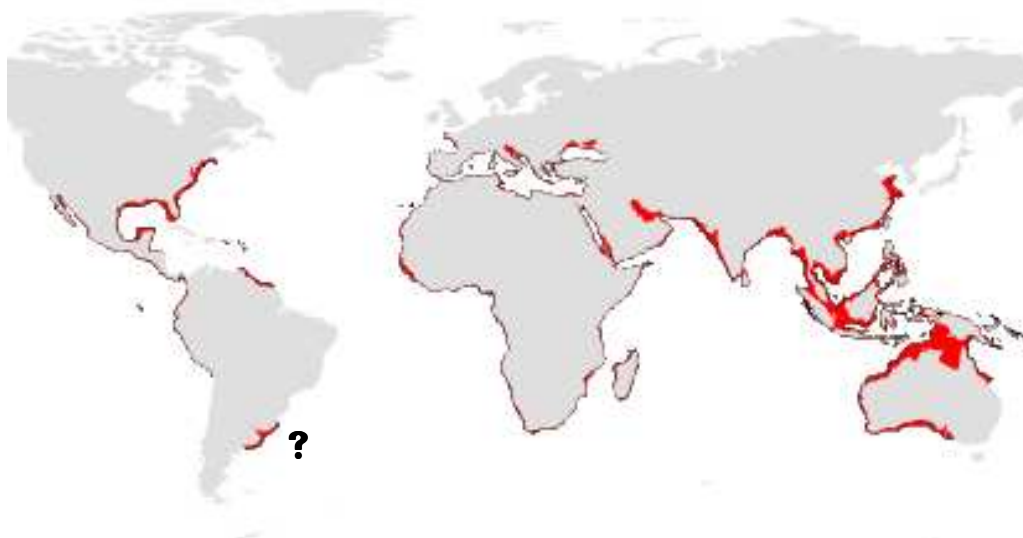


Figura 5. Distribució geogràfica de *M. cephalus* (FAO, 2009).

Pesca i aqüicultura: Els països que registren les majors captures de la llissa llobarrera són Corea i Veneçuela (FAO, 2009; Figura 6).

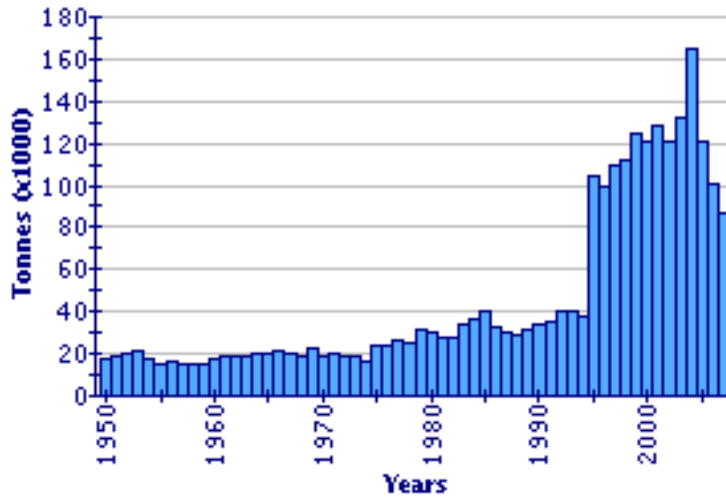


Figura 6. Captura global de *M. cephalus* (Saleh, 2006).

M. cephalus ha estat cultivat en granges durant segles de forma extensiva i semi-intensiva en aqüicultura i el seu cultiu de subsistència ha estat tradicional a la regió del Mediterrani, sud-est d'Àsia, Taiwan, Japó i Hawaii (Figura 7).

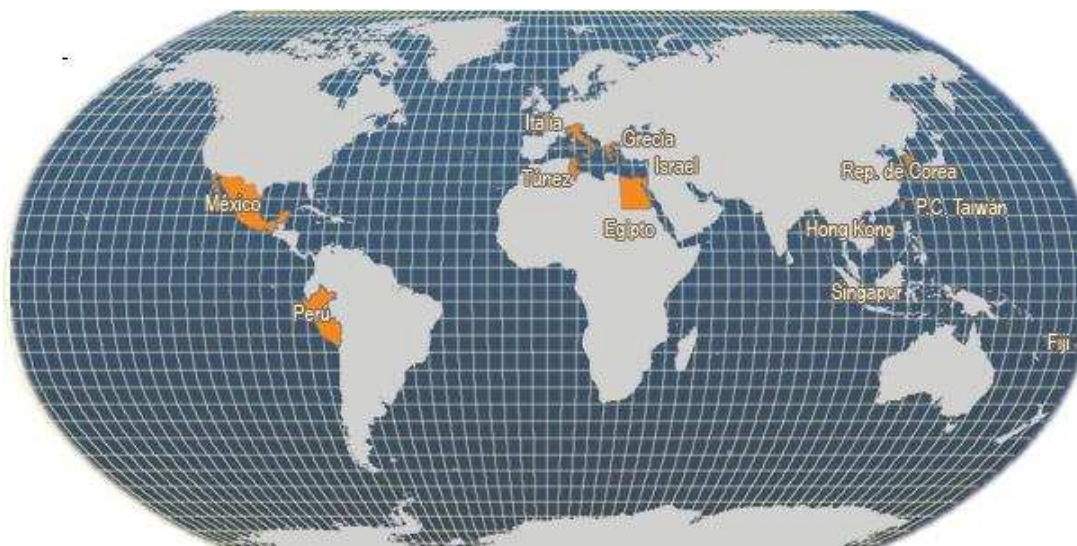


Figura 7. Països productors principals en aqüicultura de *M. cephalus* (Saleh, 2006).

Aquesta és una espècie molt important en aqüicultura a Egipte on s'ha cultivat tradicionalment en la regió del delta durant segles. A Rússia, l'aqüicultura s'ha practicat al Mar Negre i Caspi des de 1930, a Israel des del 1957, a Filipines des de 1953, a Hong Kong des de 1940, des de temps ancestrals a l'Índia i a USA s'hi ha cultivat per fer-la servir com a esquer des de 1940. A Taiwan la seva pesca i aqüicultura representen casi el 40% del total de la producció comercial des de 1960 ja que és considerat un aliment important en la regió del sud-oest asiàtic. La producció global de *M. cephalus* cultivat va augmentar de 25.600 tones al 1997 a 142.000 tones al 2003 (Figura 8).

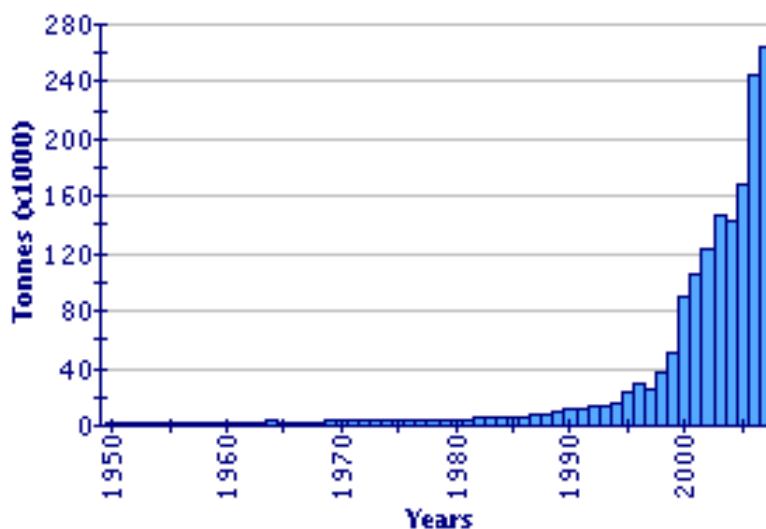


Figura 8. Producció en aqüicultura global de *M. cephalus* (Saleh, 2006).

L'augment és resultat de l'increment en la producció a Egipte que és el major productor (92% al 2003); els altres majors productors són Corea, Itàlia, Taiwan i Israel. No es coneix un comerç d'exportació, ja que la majoria de llisses cultivades es consumeixen en els països on es produeixen i a on existeix una demanda cada vegada més creixent. *M. cephalus* gaudeix d'un bon mercat en molts països d'Àsia. Es comercialitza l'individu sencer fresc, salat i congelat i la seva fresa es ven fresca o fumada; l'individu salat i fermentat es considera una "delicatessen" a Egipte i alguns altres països àrabs. A Itàlia els mètodes emprats pel creixement de les llisses són actualment molt avançats (Saleh, 2006). Especialment a Sardenya, és una espècie molt apreciada tant per la seva carn com per la seva fresa que es prepara assaonada rebent el nom de *bottarga* quan està dessecada i salada. Fins i tot, un dels plats populars regionals

són els espaguetis amb *bottarga* (www.gourmetsardinia.com/bottarga.html). La *bottarga* també pot contenir traces d'altres espècies com la *Liza aurata*, *L. ramada* i *Chelon labrosus* però resultant en una menor qualitat del producte (Murgia et al., 2002).

Problemàtica:

El fet que sigui una espècie cosmopolita però que alhora presenti una marcada diferenciació geogràfica entre diferents poblacions mundials tant a nivell morfològic (Corti i Crosetti, 1996) com molecular (Crosetti et al., 1994; Rossi et al., 1998a; Rocha-Olivares et al., 2000) ja va fer suggerir a Briggs (1960) que les diferents poblacions geogràficament aïllades de *M. cephalus* es trobarien entre poblacions de la mateixa espècie i espècies estretament relacionades (subespècies). Aquest suggeriment també deixa la porta oberta a un possible complex d'espècies, a nivell mundial, estretament relacionades.

***Mugil platanus* Günther, 1880**



Foto extreta de
www.genesisny.net/Seafood/Seafood.html

Mugil platanus es coneix habitualment com a llissa i pot arribar fins als 100 cm de llargada.

Caràcters diagnòstic: Es caracteritza per presentar estries fosques longitudinals alternades amb estries clares i l'absència casi total d'escates a l'aleta anal i zona dorsal diferenciant-se així, juntament amb *M. liza*, de la resta d'espècies del gènere *Mugil*. Es diferencia de *M. liza* per posseir més de 34 escates en la sèrie lateral (Menezes, 1983) i trobar-se en zones de distribució diferents.

Biologia: Són peixos eurihalins d'hàbitat marí i salobre, entrant ocasionalment en aigües dolces. Morfològicament exhibeix un cos esvelt i elegant. La seva pell és gruixuda i té escates de gran mida disposades de forma molt imbricada. *M. platanus* i *M. liza* tenen el cicle de vida lligat als estuaris que són el viver natural d'aquestes espècies.

Distribució: Des del sud de Brasil, passant per Uruguai i arribant fins a Argentina (Viedma) (Menezes, 1983; Cousseau et al., 2005) (Figura 9).



Figura 9. Distribució geogràfica de *Mugil platanus* (Cousseau et al., 2005; Froese and Pauly, 2009).

Pesca i aqüicultura: *M. platanus* s'explota comercialment a Argentina a on pesca tant esportivament com suportant la pesca artesanal a petita escala, principalment a Bahía de Samborombón (González Castro et al., 2009). Juntament amb *M. liza*, es tracta d'una espècie amb potencial per al cultiu en estanys. A Brasil, Uruguai i Argentina estan desenvolupant el seu cultiu capturant els juvenils o freses en el medi natural i traslladant-los a estanys d'aigües salobres o dolces on s'adapten bé (Sampaio et al., 2001; SAGPyA, 2007; Carnevia, 2008).

Problemàtica:

De *M. platanus* no existeix “espècie tipus” ó holotip (definició a la Taula 6), sinó que hi ha 4 sintipus recol·lectats al Río de la Plata d'Argentina localitzats al *British Museum (Natural History)* de Londres amb el número de registre BMNH 1878.9.10.1-4 (Cousseau et al., 2005; Eschmeyer i Fricke, 2009). No obstant, Harrison (1993) va designar l'espècimen de *Mugil platanus* recol·lectat per d'Orbigny al Río de la Plata d'Argentina MNHN 0000-6307 i conservat al *Muséum National d'Histoire Naturelle* de París com a paralectotipus de *M. cephalus*. Per aquest motiu existeix un conflicte amb l'estatus taxonòmic de *M. platanus*. Així, Thomson (1997), Harrison (2002) i Menni (2004) discrepen amb la distribució anteriorment aportada de *M. platanus*, ja que l'assignen a sinonímia del cosmopolita *M. cephalus*.

Taula 6. Terminologia segons la *International Commission of Zoological Nomenclature*.

Holotipus: Espècimen únic designat per l'autor com a l'espècimen tipus en el qual es basa un nou taxó quan en va fer la descripció original.

Sintipus: Els espècimens citats per l'autor en el moment de la publicació del nou taxó del qual cap holotipus fou designat. Tots aquests espècimens col·lectivament constitueixen el tipus portador del nou nom fins que es designa un lectotipus, llavors passen a ser el lectotipus o un dels paralectotipus.

Lectotipus: Un dels sintipus, designat com a espècimen tipus per qualsevol autor després de la publicació original del nom d'una espècie. Es designa només quan no hi ha un holotipus original.

Paralectotipus: Els sintipus que queden un cop s'ha escollit el lectotipus.

Mugil liza Valenciennes, 1836

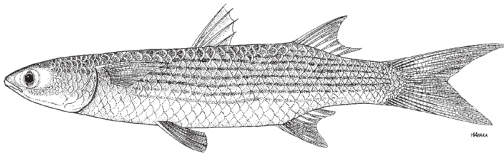


Foto extreta de Harrison (2002).

Mugil liza es coneix com a *lebranche* i habitualment mesura uns 40 cm de llargada total.

Caràcters diagnòstic: El patró de colors és idèntic al de *M. platanus*. El menor nombre d'escates en la sèrie lateral (29-34; és el que posseeix menor nombre d'escates laterals de tots els *Mugil*) i la ocurrència en una àrea geogràfica diferent la separen de *M. platanus* (34-40) (Menezes, 1983).

Biologia: Habiten en les aigües costaneres marines i en llacunes salobres; pot entrar ocasionalment en aigües dolça i la dieta probablement és similar a la de *M. cephalus*.

Distribució: Present en aigües costaneres de l'Atlàntic occidental al voltant de les Bermudes, al sud de Florida, Bahames, el Carib, les costes de Panamà, Colòmbia i Veneçuela estenent-se cap al sud fins a Rio de Janeiro (Figura 10). Més al sud és substituïda per *M. platanus* (Menezes, 1983).

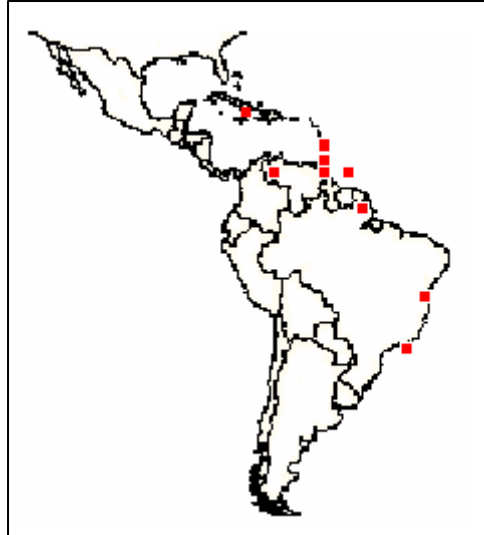


Figura 10. Distribució geogràfica de *M. liza* (Froese and Pauly, 2009).

Pesca i aqüicultura: Es pesca a Colòmbia, Cuba i Brasil, però el major registre de pesqueries es produeix a Veneçuela. S'està intentant la seva aqüicultura a Cuba i Colòmbia. Es ven fresca i salada i la seva fresa es comercialitza salada i dessecada (Harrison, 2002).

Problemàtica:

El lectotipus o espècimen tipus de *M. liza*, que no tenia holotipus original, designat per Harrison (1993) fou MNHN A.4659, recol·lectat a les illes Martiniques al Carib. Posteriorment Thomson (1997) va designar un lectotipus diferent, concretament MNHN A.1051 recol·lectat a Cayenne (Guaiana Francesa). Però, alhora *M. platanus* Günther, 1880 recol·lectat per d'Orbigny al Ríó La Plata d'Argentina MNHN 0000-6307 i conservat al *Muséum National d'Histoire Naturelle* de París que Valenciennes al 1836 va etiquetar com a sintipus de *M. liza* va passar a ser paralectotipus d'aquest taxó. Però tal i com ja s'ha indicat abans, aquest espècimen va passar a ser designat com a una sinonímia de *M. cephalus* per part de Harrison (1993) i Thomson (1997).

Aquestes discrepàncies entre els ictiòlegs especialistes del grup a l'hora d'assignar espècimens a un taxó determinat ens indica la dificultat de distingir-los utilitzant la morfologia clàssica i suggereixen una estreta relació entre *M. cephalus*, *M. platanus* i *M. liza*. Aquests fets provoquen que s'hagi de realitzar una anàlisi més profunda d'aquests tres taxa.

Mugil curema Valenciennes, 1836

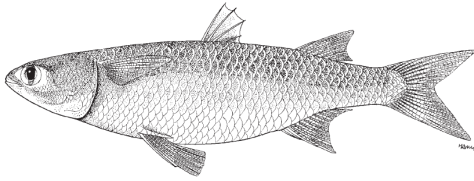


Foto extreta de Harrison (2002).

Mugil curema, normalment es coneix com a llissa blanca i comunament mesura uns 35 cm de llargada total.

Caràcters diagnòstic: Té 2 aletes dorsals fosques (la segona lleugerament més fosca), la primera amb 4 espines i la segona amb 1 espina i 8 radis tous. L'aleta anal pàl·lida-groguenca amb 3 espines i 9 radis, separant-se de *M. cephalus* que té 8 radis (Harrison, 2002).

Biologia: Habiten aigües costaneres marines i als estuaris; no és habitual trobar-la en aigua dolça. S'alimenten de detritus orgànic i material petit particulat.

Distribució: Comú a través de l'Atlàntic occidental des de Nova Escòcia, incloent Bermudes, el Carib i el Golf de Mèxic, fins al sud de Brasil. A l'Atlàntic oriental es troba des del Senegal i les illes de Cap Verd fins a Namíbia (Harrison, 2002). També és present al est del Pacífic des del Golf de Califòrnia fins a Xile (Thomson, 1997). Recentment, González Castro et al. (2006) va detectar la presència de *M. curema* a unes latituds molt més meridionals de les que es tenia constància fins a l'actualitat a l'Atlàntic occidental (Figura 11), en concret a Laguna de Mar Chiquita (Argentina). La confirmació molecular d'aquesta nova detecció de *M. curema* aportaria una redescrípció de la seva distribució a aigües sud-americanes.

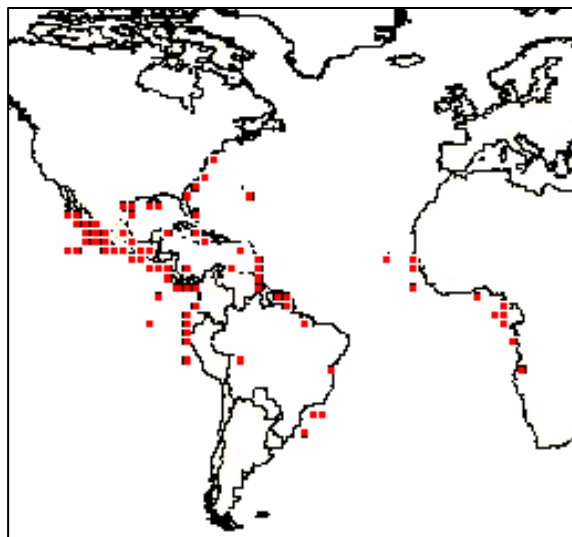


Figura 11. Distribució geogràfica de *M. curema* (Froese and Pauly, 2009).

Pesca i aquicultura: Peix molt important en l'alimentació. N'existeix una considerable pesqueria comercialitzant-se fresc, salat i congelat; la seva fresa és venuda fresca o fumada. També s'utilitza en aquicultura i com a esquer. A causa de l'interès comercial creixent d'aquesta espècie (FAO, 2007), el seu seguiment i localització al llarg del seu rang de distribució es converteix en una de les fites per tal de gestionar-ne'n de forma responsable la seva pesca.

Problemàtica:

La manca d'holotipus de *M. curema*, va fer que l'espècimen MNHN A.3638 originari de Bahia (Brasil) fos designat com a lectotipus per Harrison (1993), passant els 4 espècimens sintipus de Cuba, Maracaibo i Martinica a paralectotipus. Tot i això, sota la denominació *M. curema* s'hi amaga una curiosa mescla feta de diverses entitats taxonòmiques designades amb el mateix nom identificador. Aquest conflicte taxonòmic provoca discrepàncies en quant a la seva identificació morfològica. Així, estudis cariotípics mostren l'existència de 3 citotips diferents: $2n=28$, $2n=24$ i $2n=48$ (LeGrande i Fitzsimons, 1976; Nirchio i Cequea, 1998; Nirchio et al., 2003). El veritable citotip de *M. curema* es considera el que presenta $2n=28$, ja que fou el primer estudi cariotípic realitzat a aquesta espècie al Golf de Mèxic (LeGrande i Fitzsimons, 1976). Però, alhora, es va detectar un segon cariotip ($2n=24$) a Veneçuela que també es continua mantenint sota la mateixa denominació de *M. curema* (Nirchio i Cequea, 1998). Finalment, el tercer citotip ($2n=48$) segons alguns autors (Nirchio et al., 2003) s'ajustaria a l'espècie *M. gaimardianus* Desmarest, 1831. No obstant, l'ICZN (1994) va suprimir la disponibilitat de la nomenclatura de *M. gaimardianus* ja que la seva única publicació era una figura en el *Dictionnaire Classique d'Histoire Naturelle* però sense cap descripció acurada que l'acompanyés a més de la manca d'espècimen tipus amb el qual poder fer-la. Per tant, provisionalment se la va haver d'anomenar *Mugil* sp. a l'espera de la descripció completa d'aquesta possible nova espècie, però sota una nova nomenclatura que no inclogués "*gaimardianus*". Aquest desordre ha causat que tant el diagnòstic merístic com morfomètric d'aquest taxó s'hagi estat basant en una barreja de diverses espècies creant valors solapats i conduint cap a una identitat errònia. Llavors, el fet de poder realitzar una confirmació genètica dels diferents tipus de *M. curema* contribuiria a una nova visió del seu rang de distribució geogràfica.

Així doncs, podrien arribar a existir com a mínim 3 espècies diferents que fins ara havien estat incloses sota la mateixa nomenclatura de *M. curema*? Però alhora, també seria probable de trobar-ne'n més al llarg de l'àmplia distribució geogràfica mundial d'aquesta espècie?

El gènere *Liza* és un gènere ampli amb 22 espècies que es caracteritza pels coixinets sobre el maxil·lar i sobre el tendó que va cap a la boca diferenciant-lo de la resta de gèneres a excepció de *Chelon* i *Oedalechilus*; però *Liza* no té l'ornamentació labial d'aquests dos gèneres (Thomson, 1997).

Espècies del gènere *Liza* estudiades:

Liza aurata Risso, 1810



Foto extreta de Bauchot (1987).

Liza aurata es coneix com a llissa daurada perquè té una taca característica daurada cobrint les brànquies.

Caràcters diagnòstic: Es pot arribar a confondre amb *L. ramada*, però *L. aurata* no té dents al llavi inferior ni al palatí, les quals són dentades a *L. ramada* (Thomson, 1997).

Biologia: És una espècie costanera que entra a les llacunes i estuaris, rarament entra en aigües dolces.

Distribució: A l'Atlàntic oriental des d'Escòcia fins a les illes de Cap Verd, també es distribueix al Mediterrani, incloent el Mar Negre, i introduïda al Mar Caspi (Thomson, 1997) (Figura 12).

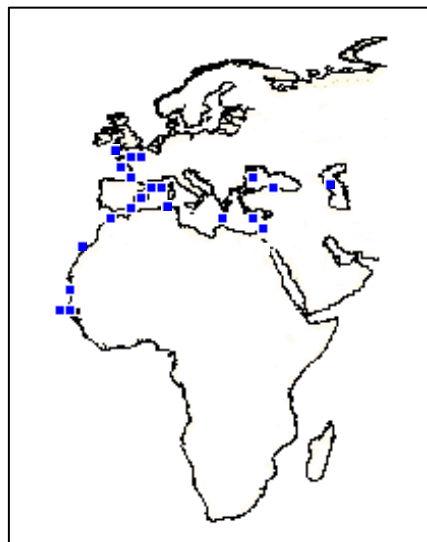


Figura 12. Distribució geogràfica de *L. aurata* basada en Froese and Pauly (2009).

Pesca i aqüicultura: Es comercialitza la seva pesca al Mar Mediterrani i al Mar Negre venent-se també fumada i assaonada, ahora també s'empra en aqüicultura al Mar Negre (Bauchot, 1987) i tradicionalment a Itàlia (Cozzolino, 2006) i a Algèria (Moussi, 2006).

Liza ramada Risso, 1826



Foto extreta de Bauchot (1987).

Liza ramada es coneix com a llissa de llavi fi.

Caràcters diagnòstic: Té dents al llavi inferior i al palatí (*L. aurata* no en té) (Thomson, 1997).

Biologia: Normalment habiten a la costa entrant a llacunes i estuaris i rius entre 8-24°C de temperatura.

Distribució: A l'Atlàntic oriental, des del Mar del Nord i Bàltic fins al nord de Cap Verd, també es distribueix al Mar Mediterrani i Mar Negre (Thomson, 1997) (Figura 13).

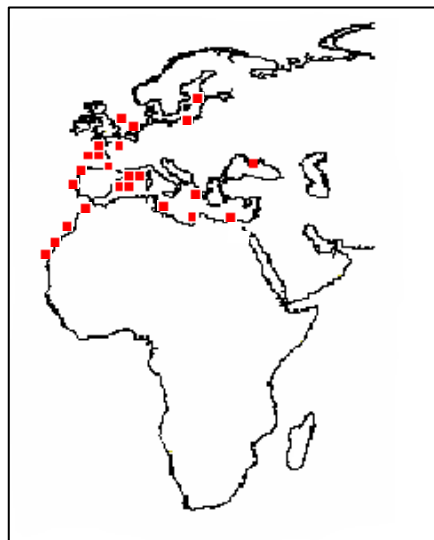


Figura 13. Distribució geogràfica de *L. ramada* basada en Froese and Pauly (2009).

Pesca i aqüicultura: Presenta pesca comercial i també s'empra en aqüicultura al Mar Mediterrani i Mar Negre, sobretot a Itàlia (Cozzolino, 2006), Israel (Shapiro, 2006) i Egipte (Salem i Saleh, 2003).

Liza saliens Risso, 1810



Foto extreta de Bauchot (1987).

Liza saliens és coneguda també com a llissa saltadora.

Caràcters diagnòstic: És la única *Liza* a part de *L. dumerilis* que té escates multicanaliculades però en té menys tant en la sèrie lateral com transversal (Thomson, 1997).

Biologia: Es troba a aigües marines costaneres i salobres.

Distribució: Costa atlàntica del Marroc fins a França, Mediterrani, Mar Negre, Mar d'Azov, i introduïda al Mar Caspi i Iran (Thomson, 1997) (Figura 14).

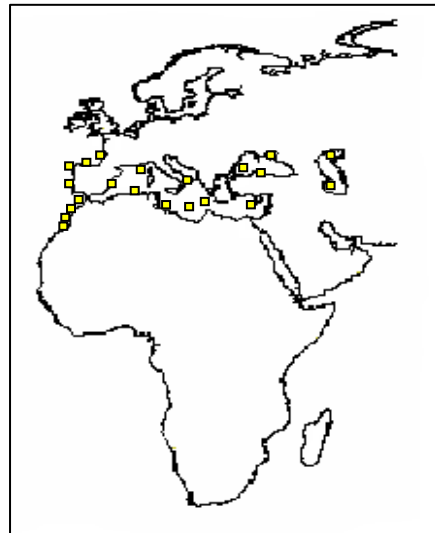


Figura 14. Distribució geogràfica de *L. saliens* basada en Froese and Pauly (2009).

Pesca i aqüicultura: La seva pesqueria és poc comercialitzada venent-se salat a Egipte (Bauchot, 1987) i cultivant-se principalment a Itàlia (Cozzolino, 2006).

Problemàtica:

La problemàtica existent en el gènere *Liza* és pel que fa referència a la seva classificació biològica, basada en caràcters morfològics, respecte a la seva relació evolutiva amb el gènere *Chelon* (descriu més avall). Diversos autors (Caldara et al., 1996; Rossi et al., 1998b, 2004; Papatropoulos et al., 2001, 2002; Turan et al., 2005; Fraga et al., 2007; Semina et al., 2007), basant-se en diferents aspectes biològics, han discutit sobre el monofiletisme (definit a la pàgina 8) de *Liza* posant en dubte el seu estatus taxonòmic com a un gènere diferenciat de *Chelon* discrepant així de la classificació tradicional.

El gènere *Chelon* es caracteritza per tenir un llavi inferior que es projecta cap a endavant horitzontalment, sense corbar-se o plegar-se cap avall i el llavi superior presenta una amplada superior a la distància existent entre els nostrils (Schultz, 1946). Consta d'una típica ornamentació labial a l'igual que els gènere *Crenimugil* i *Oedalechilus*. Tot i això, *Chelon* no té crenulacions en la cantonada de la boca, diferenciant-se de *Crenimugil*, i consta de llavis amb dents, diferenciant-se d'*Oedalechilus* (Thomson, 1997).

Espècies del gènere *Chelon* estudiades:

***Chelon labrosus* Risso, 1827**



Foto extreta de Bauchot (1987).

Chelon labrosus és anomenat també llissa de llavi gruixut.

Caràcters diagnòstic: L'ornamentació del llavi superior el diferencia d'altres mugílids. La diferent posició d'origen de la primera dorsal el diferencia del seu congènere *C. bispinosus* (Thomson, 1997).

Biologia: És una espècie costanera que entra en llacunes salobres i d'aigua dolça.

Distribució: A l'est de l'Atlàntic es distribueix des d'Escandinàvia i Islàndia cap al sud de Senegal i Cap Verd. També el trobem al Mediterrani i al Mar Negre (Thomson, 1997) (Figura 15).

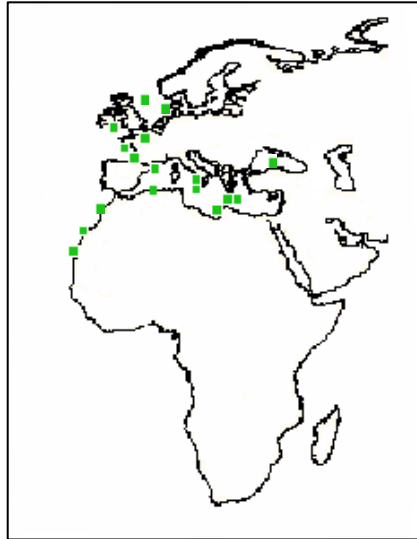


Figura 15. Distribució geogràfica de *C. labrosus* basada en Froese and Pauly (2009).

Pesca i aqüicultura: La seva pesca es comercialitza a Grècia (Hotos i Vlahos, 1998) a on també s'hi comença a practicar l'aqüicultura (Bauchot, 1987) tradicionalment desenvolupada a Itàlia (Cozzolino, 2006).

Problemàtica:

Al gènere *Chelon* existeix una discrepància entre la seva classificació biològica i la seva relació filogenètica respecte al gènere *Liza*, ja que es podrien arribar a englobar ambdós dins d'un mateix gènere, tal i com s'ha exposat en l'apartat anterior corresponent a la problemàtica existent dins del gènere *Liza*.

1.3.2. SÈRIE ATHERINOMORPHA

La sèrie Atherinomorpha consta de 3 ordres, 21 famílies i 1.552 espècies (Taula 7).

Taula 7. Classificació dels ordres i famílies de la sèrie Atherinomorpha segons Nelson (2006).

* Famílies d'aterínids en les quals s'ha centrat principalment aquest estudi.

Superordre Atherinea
Ordre Atheriniformes
Subordre Atherinopsoidei
Fam. Atherinopsidae- <i>New World silversides</i> *
Subordre Atherinoidei
Fam. Atherinidae- <i>Old World silversides</i> *
Fam. Atherionidae
Fam. Phallostethidae
Fam. Melanotaeniidae
Fam. Notocheiridae

Superordre Cyprinodonta
Ordre Beloniformes
Fam. Adrianichthyidae
Fam. Exocoetidae
Fam. Hemiramphidae
Fam. Belonidae
Fam. Scomberesocidae
Ordre Cyprinodontiformes
Fam. Aplocheilidae
Fam. Nothobranchiidae
Fam. Rivulidae
Fam. Profundulidae
Fam. Goodeidae
Fam. Fundulidae
Fam. Valenciidae
Fam. Cyprinodontidae
Fam. Anablepidae
Fam. Poeciliidae

En aquesta sèrie de peixos acanthopterygis, la mandíbula superior protractil difereix per la manca d'articulació entre el palatí i el maxil·lar (per evitar que els premaxil·lars quedin tancats en una posició sobresortida) i en la manca de lligaments creuats del rostre que s'estenen en els palatins i els capçals dels premaxil·lars, no obstant, les espècies d'*Odontesthes* tenen una forma diferent dels lligaments creuats

(Dyer, 1997). La majoria d'espècies d'aquest grup s'alimenten en superfície i, al voltant del 75%, es troben confinats a aigües dolces o salobres (Nelson, 2006).

Un focus interessant d'estudi dins de la sèrie Atherinomorpha és l'ordre Atheriniformes (Taula 7), peixos considerats com els aterínids pertanyents al Nou Món:

Ordre Atheriniformes

Als peixos d'aquest ordre se'ls coneix familiarment en anglès com a *silversides*, *rainbowfishes* i *blue eyes* i es divideixen en 2 subordres amb 6 famílies, 48 gèneres i 312 espècies (Nelson, 2006).

L'ordre Atheriniformes ha patit reestructuracions en la seva classificació des de la revisió que se'n va fer al 1994 per part de Nelson. La família Atherinidae, inclosa dins del subordre Atherinoidei, tenia 2 grups reconeguts: els aterínids del Vell Món i els aterínids del Nou Món. En la revisió posterior que va fer Nelson al 2006, els aterínids del Vell Món es van continuar mantenint dins de la família Atherinidae en el subordre Atherinoidei, però per als aterínids del Nou Món fou creada la nova família Atherinopsidae que forma part del nou subordre Atherinopsoidei (Taula 7). El reconeixement de 2 subordres en els Atheriniformes per part de Nelson (2006) reflecteix els resultats cladístics basats en la morfologia de Dyer i Chernoff (1996) que mostren que la família Atherinopsidae és el taxó germà de la resta de famílies d'Atheriniformes. No obstant, la nostra comprensió dins d'aquest ordre d'aterínids pot millorar ostensiblement investigant les relacions filogenètiques basades en les dades moleculars dels taxa d'interès que en formen part.

Subordre Atherinopsoidei

Aquest subordre es compon exclusivament de la família Atherinopsidae (Taula 7):

Família Atherinopsidae - *New World silversides*

La família consta de 2 subfamílies amb 11 gèneres i 108 espècies (Nelson, 2006). Són peixos marins (pelàgic-costaners) i d'aigua dolça; d'ambient temperat a tropical, distribuït-se al nord, centre i sud d'Amèrica, és a dir, es troben restringits al Nou Món (Nelson, 2006).

Trets generals de la família: La longitud màxima en la majoria d'adults és de 15 cm i en algunes espècies del Pacífic oriental, al voltant d'1 m. Totes les espècies són ovíparas i presenten els ulls relativament grans en relació a la mida del cap (Chernoff, 2002). Presenten 2 aletes dorsals àmpliament separades, la primera amb 2-9 espines flexibles i la segona amb 1 espina seguida per radis tous; aletes pectorals elevadament inserides al cos. Cos sovint translúcid, amb una tira lateral platejada. Aquests caràcters morfològics i els prèviament aportats per Dyer i Chernoff (1996), Dyer (1997) i Dyer (1998) recolzen la monofília d'aquest grup i que aquest sigui el grup germà de la resta d'Atheriniformes. Així, com ja s'ha indicat prèviament, els aterínids del Nou Món que estaven anteriorment reconeguts com a una subfamília d'Atherinidae (Nelson, 1994) en foren remoguts i se'ls va reconèixer el nivell de família, Atherinopsidae (Nelson, 2006).

Caràcters diagnòstic: Els peixos de la família Atherinopsidae són fàcilment diferenciables dels peixos de la família Atherinidae, pertanyents al Vell Món, pel fet de tenir el premaxil·lar protractil, la terminació del premaxil·lar expandida, el premaxil·lar sense sistema postmaxil·lar i el canal sensitiu preopercular connectat al canal mandibular (Chernoff, 2002).

Problemàtica:

La major part dels representants de la família Atherinopsidae formen part del gènere *Odontesthes*, que és de considerable importància econòmica tant per la pesca esportiva, artesanal com l'aqüicultura (Chernoff, 2002). Tanmateix, no existeixen estudis que hagin utilitzat la filogènia molecular per analitzar-ne'n les seves relacions evolutives i, fins i tot, hi ha espècies de les quals no hi ha constància de cap estudi molecular ni genètic.

El gènere *Odontesthes* consta de 19 espècies reconegudes, i una àmplia distribució a Sud-amèrica a on familiarment se'ls coneixen com a *pejerreyes*. Es distribueix en aigües marines costaneres i drenatges temperats d'aigua dolça. Les formes marines es distribueixen des de l'extrem de Tierra del Fuego (Xile) fins al Perú, al vessant pacífic, i fins al sud de Brasil, al vessant atlàntic. Les formes d'aigua dolça s'estenen des de la Patagònia fins a La Serena (Xile) i fins a Rio Grande do Sul (Brasil) (Dyer, 2006).

Espècies del gènere *Odontesthes* estudiades:

Odontesthes argentinensis Valenciennes, 1835

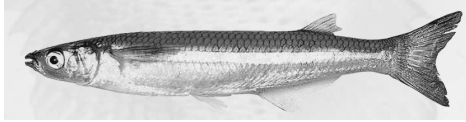


Foto extreta de Cousseau and Perrota (2003).

Odontesthes argentinensis es coneix comunament com a *pejerrey de mar*.

Caràcters diagnòstic: Es diferencia per tenir les escates predorsals crenulades i 26-30 espines branquials (Dyer, 2006).

Biologia: És una espècie costanera àmpliament distribuïda en ambients marins i en estuaris.

Distribució: Es distribueix a l'Atlàntic occidental des del sud de Brasil, passant per Uruguai, fins a la província argentina de Chubut (Figura 16).

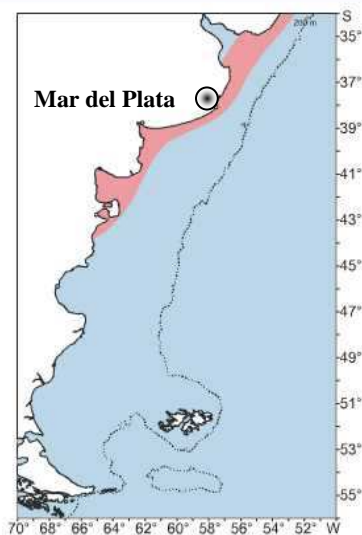


Figura 16. Distribució geogràfica d'*O. argentinensis* (Cousseau and Perrota, 2003).

Pesca i aqüicultura: Es pesca amb flota de rada i es comercialitza sencer, fresc o congelat en els mercats locals (Cousseau i Perrota, 2003).

Problemàtica:

Dos estudis moleculars n'han comparat la forma estuarial i marina proposant-les com a dues possibles espècies incipients (Beheregaray i Levy, 2000; Beheregaray i Sunnucks, 2001), però aquesta indicació discrepa del punt de vista de Dyer (2006).

Odontesthes smitti Lahille, 1929



Foto extreta de Cousseau and Perrota (2003).

El nom comú d'*Odontesthes smitti* és *pejerrey* d'aleta groga o *cornu*.

Caràcters diagnòstic: Es distingeix pel patró de coloració, especialment el de les aletes que les té grogues amb un marge fosc (Cousseau i Perrota, 2003).

Biologia: Es troba en aigües marines costaneres.

Distribució: Es distribueix a l'Atlàntic occidental des d'Uruguai fins a Tierra del Fuego, passant per l'Estret de Magallanes cap al nord fins a Puerto Natales (Xile) al Pacífic (Dyer, 2006) (Figura 17).



Figura 17. Distribució geogràfica d'*O. smitti* basada en Dyer (2006).

Pesca i aqüicultura: Es pesca al llarg de la costa amb flota de rada i es comercialitza als mercats regionals tant fresc com congelat (Cousseau i Perrota, 2003).

Problemàtica:

Tot i que la seva comercialització és del mateix tipus i importància que *O. argentinensis* (Cousseau i Perrota, 2003), no s'han realitzat estudis genètics d'aquesta espècie fins al present treball.

Odontesthes incisa Jenyns, 1841

Foto extreta de Cousseau and Perrota, 2003.

Odontesthes incisa es coneix també com a *pejerrey* d'ulls negres o *cornalito*.

Caràcters diagnòstic: Aquesta espècie és característicament de talla petita, rarament supera els 15 cm de longitud total, i presenta escates crenades i dents del tipus caní.

Biologia: El seu hàbitat està restringit a zones marines costaneres.

Distribució: Es distribueix des de Laguna de Dos Patos (Brasil) fins a Golfo Nuevo (Argentina) (Cousseau i Perrota, 2003) (Figura 18).



Figura 18. Distribució geogràfica d'*O. incisa* (Cousseau and Perrota, 2003).

Pesca i aqüicultura: Es pesca localment amb flota de rada comercialitzant-se fresc i en menor grau congelat per als mercats de la regió (Cousseau i Perrota, 2003).

Problemàtica:

A l'igual que *O. smitti*, no existeixen, fins a la realització d'aquesta tesi doctoral, dades genètiques d'aquesta espècie.

Odontesthes bonariensis Valenciennes, 1835



Foto extreta del Fishbase (Sara Beatriz Sverlij).

Odontesthes bonariensis es coneix com a *pejerrey blanco* o argentí.

Caràcters diagnòstic: Els individus d'aquesta espècie són els que tenen una major mida dins dels Atheriniformes i es caracteritzen per presentar de 30-40 espines branquials (Dyer, 2006).

Biologia: És un peix d'aigua dolça que habita en llacs i llacunes. És una espècie de creixement ràpid, té una alta taxa de reproducció, una molt bona qualitat de carn i és resistent a les baixes temperatures (Tejedor, 2001).

Distribució: És natiu de la Província de Buenos Aires (Argentina) i Rio Grande do Sul (Brasil) (Dyer, 2006) (Figura 19).



Figura 19. Poblacions autòctones d'*O. bonariensis* basades en Dyer (2006).

Pesca i aqüicultura: És una espècie important en aqüicultura des del 1900. A més, fou introduïda a Xile i Bolívia als 1940 i al Japó i a Itàlia a finals dels 1960 (Dyer, 2006). Cal mencionar l'èxit i el desenvolupament sostenible al Japó a on es considera com a una de les quatre espècies de peixos en aqüicultura més importants i de major consum, comercialitzant-se sencera i en filets (Tejedor, 2001). El fet de ser un dels peixos d'aigua dolça més buscats pels pescadors recreatius, esportius i comercials fa que sigui l'espècie més utilitzada per a la repoblació en aigües dolces a Argentina gràcies a la seva gran adaptabilitat i valoració anteriorment mencionada (Dyer, 2006).

Problemàtica:

Cal destacar que, tot i la transcendència d'aquesta espècie, no hi ha cap estudis de filogenia molecular que l'hagi inclòs a les seves anàlisis fins a l'actualitat.

***Odontesthes hatcheri* Eigenmann, 1909**

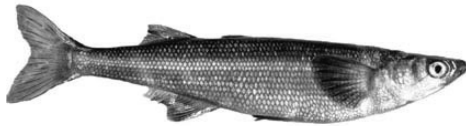


Foto extreta de www.irresistibleflyshop.com.ar/pp2.gif

Odontesthes hatcheri es coneix com a *pejerrey patagónico* o negre.

Caràcters diagnòstic: Es caracteritza per exhibir un cos esvelt i dinàmic, presentar entre 21-27 espines branquials i es diferencia d'*O. bonariensis* per tenir un cos més robust i fosc i assolir mides inferiors (Dyer 2006).

Biologia: És un peix d'aigua dolça com *O. bonariensis* i es troba a llacs i rius. Curiosament, a les zones a on s'ha introduït *O. bonariensis* hi ha evidències que pot hibridar-hi (Strüssmann et al., 1997; Yoshizaki et al., 1997; Dyer, 2006).

Distribució: Es distribueix a la Patagònia d'Argentina i Xile (Dyer, 2006) (Figura 20).



Figura 20. Poblacions autòctones d'*O. hatcheri* basades en Dyer (2006).

Pesca i aqüicultura: És un peix important en la regió patagònica utilitzant-se com a esquer, en la pesca esportiva i per al consum humà (Dyer, 2006).

Problemàtica:

A l'igual que *O. bonariensis*, cal remarcar que tampoc hi ha estudis filogenètics basats en l'anàlisi molecular que la incloguin fins al present treball.

Subordre Atherinoidei

Aquest subordre consta de 5 famílies (Taula 7) i, d'acord amb Dyer i Chernoff (1996) i recollit a Nelson (2006), forma un grup monofilètic germà de l'anterior (subordre Atherinopsoidei). Dins del subordre Atherinoidei ens hem centrat en la família Atherinidae (Taula 7), peixos considerats com els aterínids pertanyents al Vell Món:

Família Atherinidae - *Old World silversides*

Aquesta família consta de 3 subfamílies amb 12 gèneres i al voltant de 60 espècies. Els Atherinidae són peixos marins (pelàgic-costaners), d'estuaris i d'aigua dolça que poden assolir una longitud màxima d'al voltant de 10 cm (Nelson, 2006).

La major part de les espècies de la família Atherinidae succeeixen principalment al Vell Món i a l'oest de l'Indo-Pacífic, a excepció de 3 espècies que es troben a aigües subtropicals i tropicals de l'Atlàntic occidental, contrastant amb els *silversides* del Nou Món de la família Atherinopsidae que es distribueixen exclusivament a Amèrica (Nelson, 2006).

Trets generals de la família: Consten de 2 aletes dorsals àmpliament separades, la primera amb 2-5 espines flexibles i la segona amb 1 espina seguida de radis tous. El cos, sovint translúcid o verd-groguenc a la superfície dorsal, amb tira lateral platejada. Anteriorment, Nelson (1994) incloïa dins d'aquesta família els membres ubicats actualment a Atherinopsidae (Taula 7).

Caràcters diagnòstic: Aquests peixos són fàcilment diferenciables dels Atherinopsidae sobretot per no tenir el premaxil·lar protractil (Chernoff, 2002).

Problemàtica:

La sistemàtica dels aterínids del Vell Món pel que fa a la seva relació amb els Atherinopsidae (Nou Món) no ha estat contrastada molecularment ja que la seva separació en dos subordres diferenciats, Atherinoidei i Atherinopsoidei respectivament, no s'ha verificat genèticament fins al present treball.

A més, altres qüestions sistemàtiques han sorgit dins de la pròpia família Atherinidae, concretament en el seu gènere més representatiu *Atherina*.

El gènere *Atherina* consta de 5 espècies. Aquest gènere es troba primordialment a l'Atlàntic oriental (incloent el Mediterrani) i pertany a la subfamília Atherininae (Nelson, 2006). Aquest gènere és l'únic representant de la família Atherinidae en aigües del Mar Mediterrani.

Espècies del gènere *Atherina* estudiades:***Atherina hepsetus* Linnaeus, 1758**

Foto extreta de www.geocities.com/greekfisher

Es coneix comunament com a moixó o *Mediterranean sand smelt*.

Caràcters diagnòstic: Es caracteritza per presentar 59-65 escates a la línia lateral i 53-57 vèrtebres, acostumat a assolir els 13 cm de llargada i diferint d'altres aterínids de la zona com *A. boyeri* (descrita més avall) per tenir una boca menys obliqua. És un peix de color iridiscent amb petits punts negres sobres les escates, presentant una banda platejada a cada costat del cos, però sovint amb la vora negra (de Sostoa et al., 1990).

Biologia: És una espècie litoral. Tot i que gaudeix d'una certa capacitat eurihalina, la seva entrada a les aigües dolces i salabroses pren un caràcter més accidental.

Distribució: És un aterínid pròpiament de litoral mediterrani tot i que a vegades se'l troba en llacunes marines (França) i estuaris (Portugal), sent menys freqüent la seva presència al Mar Negre i Adriàtic. També habita a l'Atlàntic, tant a les costes de la Península Ibèrica com del Marroc i Madeira (Maugé, 1990) (Figura 21).



Figura 21. Distribució geogràfica d' *A. hepsetus* basada en Maugé, 1990).

Pesca i aqüicultura: Les captures anuals d'*A. hepsetus* al Mediterrani assoleixen les 160 tones sent una espècie considerablement comercialitzada (Pallaoro et al., 2007).

Problemàtica:

Sobre aquesta espècie no es té cap mena de dubte sobre la seva entitat taxonòmica. No obstant, es troba estretament relacionada amb la seva congènere *A. boyeri* (descrita més avall) de la qual sí que existeixen conflictes taxonòmics.

***Atherina boyeri* Risso, 1810**



Foto extreta de www.mapya.es/pesca

Es coneix de forma comú com a joell, peix sense sang o *big-scale sand smelt*.

Caràcters diagnòstic: *A. boyeri* és d'una coloració poc cridanera, casi translúcid, tot i que té una banda platejada als dos costats del cos. Consta de 21-39 branquiospines, 41-49 escates transversals i 40-49 vèrtebres, podent arribar fins als 13 cm de llargada. Característicament presenta l'ull molt gran ocupant la major part del cap, el qual és relativament llarg comparat amb el d'altres espècies del gènere, i difereix d'*A. hepsetus* perquè la boca és més obliqua que l'anterior.

Biologia: És un peix molt eurihalí que forma poblacions sempre a prop de la costa, tant en aigües marines com salabroses o dolces (tot i que més rarament).

Distribució: És un altre peix propi de la Mediterrània, incloent el Mar Negre, Mar Caspi i el d'Azov, distribuïnt-se també a l'Atlàntic oriental, des d'Espanya i Portugal fins a Mauritània i Madeira i a algunes localitats aïllades a Anglaterra i Holanda (Maugé, 1990) (Figura 22). A Espanya es té coneixement de poblacions a gairebé totes les desembocadures dels rius de Llevant i sud d'Espanya així com d'algunes exclusivament d'aigua dolça a les conques del Guadalquivir i Tajo (de Sostoa et al., 1990).



Figura 22. Distribució geogràfica d' *A. boyeri* basada en Maugé (1990).

Pesca i aqüicultura: Actualment al delta de l'Ebre té una certa importància econòmica en les pesqueries de llacunes. A part de la seva comercialització directa, també juga un paper important a la cadena alimentària ja que constitueix l'aliment d'altres espècies com l'anguila i el llobarro (de Sostoa et al., 1990).

Problemàtica:

Dins d' *A. boyeri* s'ha suggerit l'existència d'un complex d'espècies associades a 3 morfoecotips que es correspondrien a la forma marina (*A. boyeri*), a la forma marina amb taques fosques al llarg de la línia lateral (*A. punctata*) i a una forma llacunal (*A. lagunae*) (Focant et al., 1999; Trabelsi et al., 2002a, b; Klossa-Kilia et al., 2002, 2007; Astolfi et al., 2005; Francisco et al., 2008).

1.3.3. RELACIÓ ENTRE MUGILOMORPHA I ATHERINOMORPHA

Dins dels peixos Acanthopterygii (Taula 5), la relació filogenètica entre la sèrie Mugilomorpha (veure pàgina 24) i la sèrie Atherinomorpha (veure pàgina 42) roman oberta, existint dues propostes morfològiques principals:

- 1) Atherinomorpha és el taxó germà de Mugilomorpha i ambdós alhora de Percomorpha (Figura 23A= Stiassny, 1993; Figura 23B= Nelson, 2006).

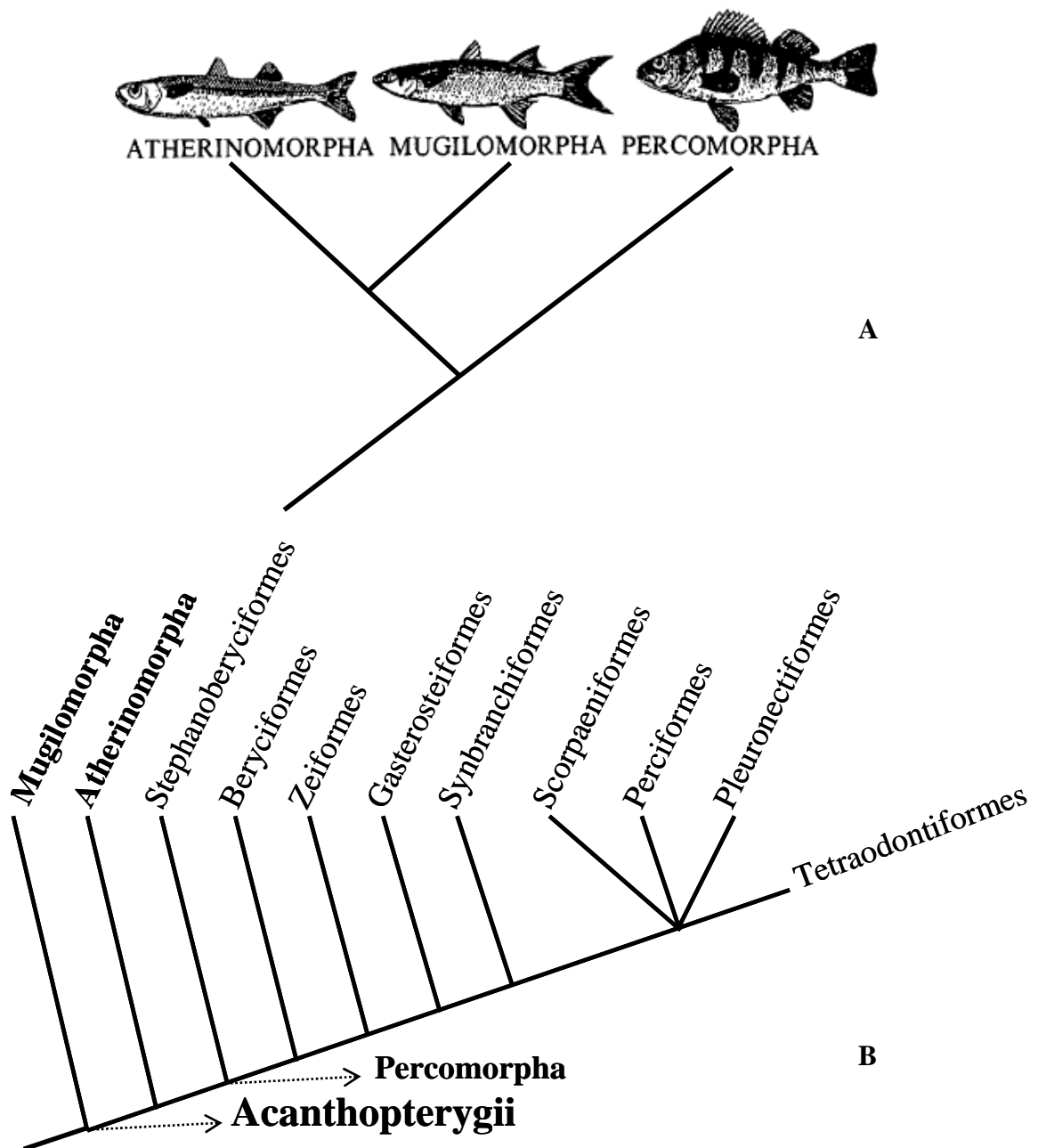


Figura 23. Atherinomorpha com a taxó germà de Mugilomorpha. A= Stiassny, 1993; B= Nelson, 2006.

- 2) Atherinomorpha i Mugilomorpha apareixen juntes en una politomia, anomenada Smegmamorpha, acrònim de les inicials SMEGMA dels sis taxa que en conformen el grup (reconeixent als Mastacembeloidei, subordre dels Synbranchiformes com a un component del grup). Els Smegmamorpha apareixen inclosos dins dels Percomorpha (Figura 24= Johnson i Patterson, 1993).

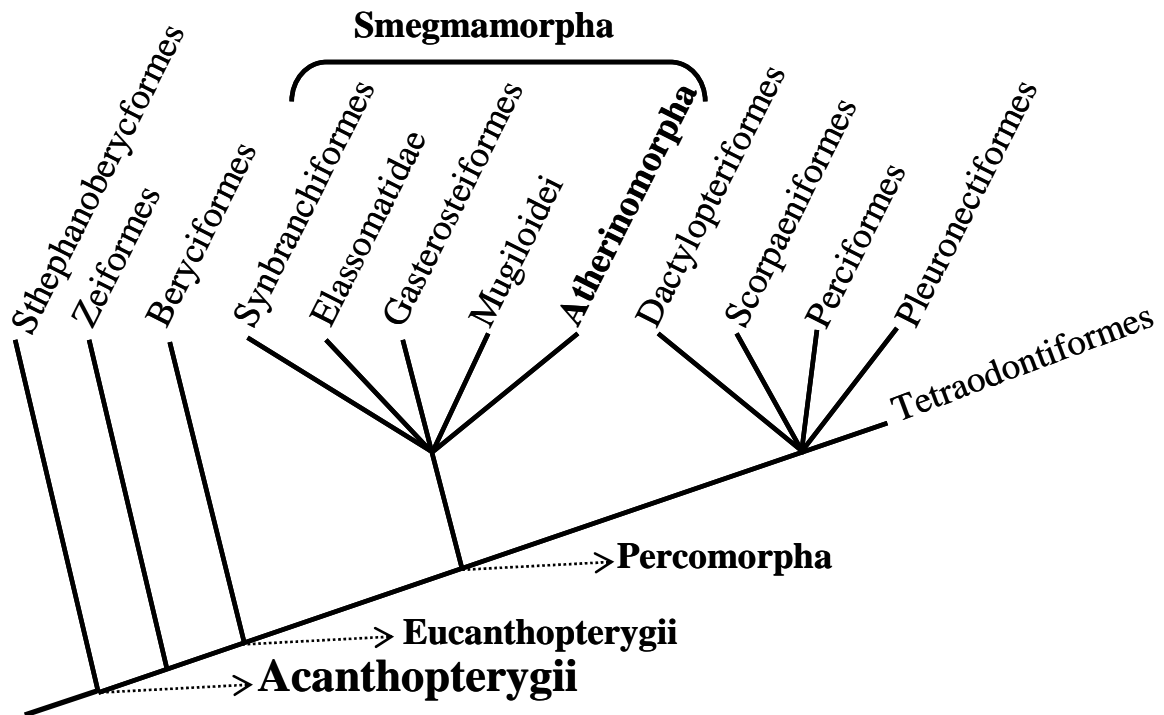


Figura 24. Atherinomorpha i Mugilomorpha inclosos en la politomia Smegmamorpha (Johnson and Patterson, 1993).

Problemàtica:

Les contradiccions entre aquestes dues alternatives morfològiques principals fan que calguin estudis moleculars per establir quines són les relacions filogenètiques entre mugílids i aterínids.

1.4. OBJECTIUS

Observant tant les discrepàncies o problemàtiques existents entre la classificació biològica, basada en la morfologia clàssica, i les relacions filogenètiques proposades prèviament dels grups de peixos Acanthopterygii sota estudi, així com la manca d'informació molecular per part d'algunes de les seves espècies, ens vam plantejar els següents objectius:

1. Inferir les relacions filogenètiques dins de la sèrie Mugilomorpha.
 - 1.1 Identificar molecularment individus de *Mugil curema* a Laguna de Mar Chiquita (Argentina), primers exemplars trobats fins a l'actualitat.
 - 1.2 Establir molecularment l'existència de més d'una espècie sota la denominació *Mugil curema*.
 - 1.3 Establir el grau de diferenciació genètica entre *Mugil platanus*, *Mugil liza* i *Mugil cephalus*.
 - 1.3.1. Establir el grau de diferenciació genètica entre *Mugil platanus*, i *Mugil cephalus*.
 - 1.3.2. Establir el grau de diferenciació genètica entre *Mugil platanus* i *Mugil liza*.
 - 1.3.3. Establir el grau de diferenciació genètica entre diferents poblacions mundials de la cosmopolita *Mugil cephalus*.
 - 1.4 Establir les relacions filogenètiques entre els gèneres *Mugil*, *Liza* i *Chelon*.
2. Inferir les relacions filogenètiques dins de la sèrie Atherinomorpha.
 - 2.1 Aportar les primeres dades genètiques d'espècies d'*Odontesthes*.
 - 2.2 Realitzar la primera filogènia molecular del gènere *Odontesthes*.
 - 2.3 Contrastar l'existència d'un complex d'espècies a nivell molecular dins d'*Atherina boyeri*.
 - 2.4 Determinar la relació filogenètica entre *Atherina hepsetus* i les possibles espècies constituents del complex *Atherina boyeri*.
 - 2.5 Determinar les relacions filogenètiques entre el subordre Atherinopsoidei i el subordre Atherinoidei.
3. Establir la relació filogenètica entre la sèrie Mugilomorpha i Atherinomorpha.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. MATERIAL BIOLÒGIC

En aquest estudi, s'han caracteritzat seqüències de mtDNA d'un total de 162 individus pertanyents a 8 espècies morfològicament identificades, mitjançant les claus taxonòmiques de Menezes (1983) i Thomson (1997), de l'Ordre Mugiliformes corresponents als gèneres *Mugil*, *Liza* i *Chelon* i a 8 espècies de l'Ordre Atheriniformes corresponents als gèneres *Odontesthes*, *Atherina* i *Melanotaenia*. Les mostres dels espècimens han estat recol·lectades a diferents localitats de l'Atlàntic occidental, concretament a Estats Units, Cuba, Brasil, Uruguai i Argentina; al Mediterrani s'han obtingut mostres de diferents localitats espanyoles; així com una mostra de la vessant atlàntica del Marroc; i, finalment, quatre individus foren comprats a una botiga de peixos d'aquari pels quals es desconeix la procedència original (Taula 8; Figura 25). Totes aquestes mostres es troben dipositades a la col·lecció de teixits del Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona.

Als individus capturats, que foren posteriorment congelats, se'ls hi va practicar una escissió al teixit muscular de la part dorsal. Les mostres de teixit es guardaren en tubs amb etanol al 95% per a la seva conservació i emmagatzematge fins al moment del seu processament analític al laboratori.

Taula 8. Espècies, localitats i nombre d'individus (n) dels taxons estudiats. Classificació segons Nelson (2006).

Classificació/Espècies	País	Localitat	n
Sèrie Mugilomorpha			
Ordre Mugiliformes			
Família Mugilidae			
<i>Mugil cephalus</i>	Espanya	Palamós	3
		Llacuna del Ter Vell	7
	Estats Units	Galveston Bay	5
<i>Mugil platanus</i>	Brasil	Rio Grande do Sul	2
	Uruguai	Montevideo	6
	Argentina	Bahía de Samborombón	11
		Laguna de Mar Chiquita	18
		Viedma	6
		Laguna de San Lorenzo	16
<i>Mugil liza</i>	Cuba	Tunas de Zaza	6
<i>Mugil curema</i>	Estats Units	Galveston Bay	4
	Argentina	Laguna de Mar Chiquita	18
		Mar del Plata	14
	Brasil	San Salvador de Bahía	1
<i>Liza aurata</i>	Espanya	Palamós	3
<i>Liza ramada</i>	Espanya	Llacuna del Ter Vell	3
<i>Liza saliens</i>	Marroc	Moulay Bouselham lagoon	7
<i>Chelon labrosus</i>	Espanya	Llacuna del Ter Vell	7
Sèrie Atherinomorpha			
Ordre Atheriniformes			
Família Atherinopsidae			
<i>Odontesthes argentinensis</i>	Argentina	Laguna de Mar Chiquita	1
		Mar del Plata	2
<i>Odontesthes smitti</i>	Argentina	Mar del Plata	3
<i>Odontesthes incisa</i>	Argentina	Mar del Plata	3
<i>Odontesthes bonariensis</i>	Argentina	Laguna de Gómez	3
<i>Odontesthes hatcheri</i>	Argentina	Lago Nahuel Huapi	1
Família Atherinidae			
<i>Atherina hepsetus</i>	Espanya	Calella de Palafrugell	4
<i>Atherina boyeri</i>	Espanya	Laguna del Mar Menor	4
Família Melanotaeniidae			
<i>Melanotaenia</i> sp.	Desconegut	Desconegut	4
		Nombre total d'individus	162



Figura 25. Localització geogràfica de les mostres analitzades.

2.2. EXTRACCIÓ, AMPLIFICACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

Abans de l'extracció del DNA, es van incubar aproximadament 100 mg de múscul durant tota la nit en agitació a 37°C amb 600 µl de tampó TENS (50 mM Tris [pH 8.0], 100 mM EDTA [pH 8.0], 100 mM NaCl, 2% sodi dodecil sulfat) amb l'objectiu d'obtenir el llisat cel·lular i alliberar-ne'n el DNA i 40 µl (20 mg/ml) de proteïnasa K per tal d'evitar la digestió del DNA per part de les nucleases presents a la cèl·lula. La totalitat del DNA genòmic va ser extret d'acord amb el mètode estàndard de fenol : cloroform : alcohol isoamílic segons Sambrook et al. (1989) amb lleugeres modificacions de Viñas et al. (2004), però emprant com a mínim dues rentades amb etanol al 70% a l'últim pas del protocol fins l'obtenció d'un resultat satisfactori. Finalment, el DNA va ser resuspès en 75 µl de dd H₂O.

La reacció en cadena de la polimerasa es va fer seguint el procediment estàndard de Saiki et al. (1988). Els marcadors mitocondrials que es van amplificar foren els següents:

- gen que codifica pel citocrom b (cytb)
- gen que codifica pel RNA transferent de la Treonina (tRNA-Thr)
- gen que codifica pel RNA transferent de Prolina (tRNA-Pro)
- la regió control (RC)
- gen que codifica pel RNA transferent de Fenilalanina (tRNA-Phe)
- gen que codifica per la subunitat petita del RNA ribosomal (12S rRNA)
- gen que codifica per la subunitat I de la citocrom c oxidasa (COI)

Les amplificacions dels diferents marcadors moleculars foren dutes a terme en un volum final de 50 µl que contenia 5 µl de tampó GeneAmp 10X PCR buffer II (Applied Biosystems) d'1.5 mM, 4 µl MgCl₂ de 25 mM, 4µl dNTP de 10 mM, 2 µl de cada *primer* de 10 µM, 1.25 unitats d'AmpliTaq DNA polimerasa (Applied Biosystems), 2 µl de mostra (10-100 ng) i finalment 30.75 µl de dd H₂O. Es va obtenir l'amplificació de la doble cadena dels marcadors mitocondrials utilitzant els *primers* descrits a la Taula 9 i Figura 26.

Taula 9. Primers utilitzats en la PCR i seqüenciació dels marcadors mitocondrials estudiats.

Primers L	Seqüència del primer (5' → 3')	Autor
<i>L14850-CYB</i>	GCC TGA TGA AAC TTT GGC TC	Miya i Nishida, 1999
<i>L15927-Thr</i>	AGA GCG TCG GTC TTG TAA TCC G	Miya i Nishida, 2000
<i>DLHR</i>	CAT CTG GTT CTT ACT TCA GG	Tiedemann et al., 1996
<i>L1091</i>	CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT	Kocher et al., 1989
<i>FishF2</i>	TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC	Ward et al., 2005
Primers H	Seqüència del primer (5' → 3')	Autor
<i>H15560-CYB</i>	TAG GCA AAT AGG AAG TAT CA	Miya i Nishida, 1999
<i>CSBDH</i>	TGA ATT AGG AAC CAG ATG CCA G	Alvarado Bremer et al., 1995
<i>12SAR-H</i>	ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT	Palumbi et al., 1991
<i>H1358-12s</i>	CGA CGG CGG TAT ATA GGC	Miya i Nishida, 2000
<i>H1358-12S</i>	CGA CGG CGG TAT ATA GGC	Miya i Nishida, 2000
<i>H1478</i>	TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG T	Kocher et al., 1989
<i>FishR1</i>	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	Ward et al., 2005

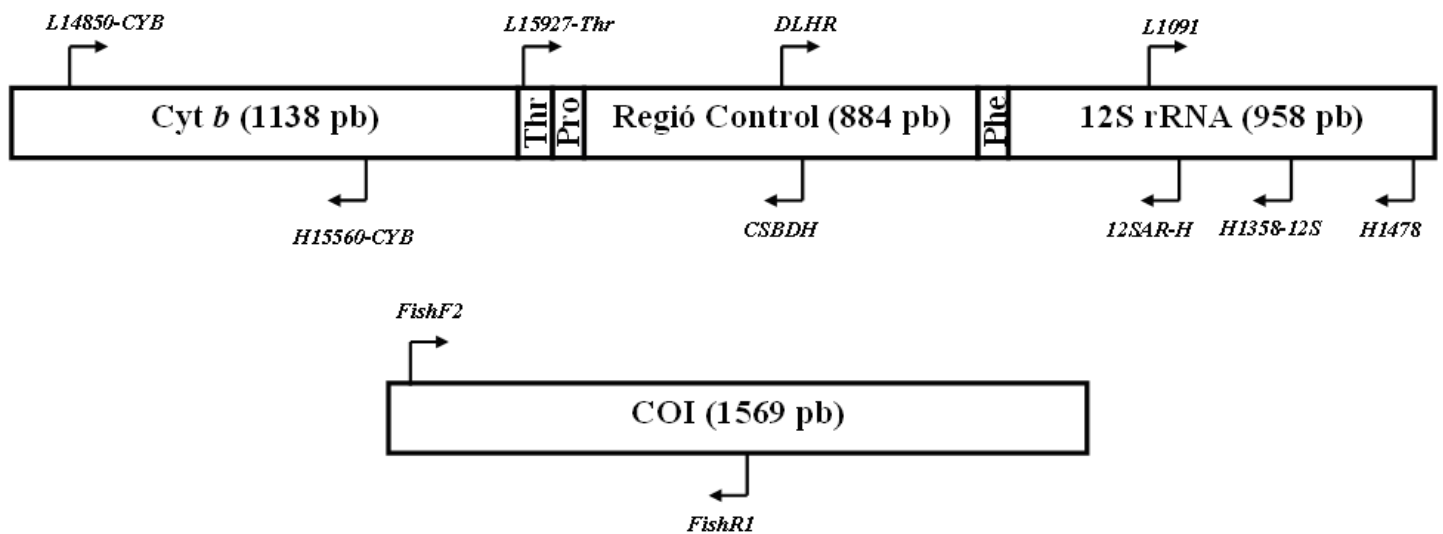


Figura 26. Esquema dels marcadors moleculars amb la zona d'hibridació dels primers.

La reacció en cadena de la polimerasa consistí en un pas inicial de desnaturalització de 3' a 94°C, seguit per 35 cicles; cada cicle comprèn una desnaturalització a 94°C durant 1', hibridació a 52°C durant 1' i extensió a 72°C durant 2', el darrer pas consta d'una extensió final a 72°C durant 5'. Es van tenir en compte precaucions estàndard, que inclouen l'ús de controls negatius i positius, amb la finalitat de detectar possibles contaminacions i problemes relacionats. Els fragments amplificats van ser comprovats en un gel d'agarosa a l'1% amb bromur d'etidi (0.5 mg/ml) i netejats amb un *kit* de purificació GFX PCR DNA (Ammersham Biosciences). En alguns casos es va haver de retallar la banda, amb el pes molecular corresponent al fragment amplificat desitjat, per acabar de purificar el producte que, finalment, fou tornat a netejar amb el *kit* de purificació.

Cada fragment purificat fou seqüenciat mitjançant el mètode dels didesoxinucleòtids (Sanger i Coulson, 1975) amb els *primers* usats per a l'amplificació. La reacció de seqüenciació fou realitzada utilitzant el *kit Dye Terminator Cycle* (dRhodamine, Applied Biosystems) que consistí en 26 cicles a 96°C durant 30'', 50°C durant 15'' i 60°C durant 4'. Els productes de seqüenciació foren precipitats amb etanol, acetat sòdic (3M pH=4.6) i EDTA (125 mM). Finalment, el *pellet* fou resuspès en 25 µl de *Template Suppression Reagent* (Applied Biosystems) i carregat en el seqüenciador automàtic d'un capil·lar *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), al mateix LIG, per tal de llegir les seqüències mitjançant una electroforesi capil·lar.

Anotació: Durant l'etapa final del treball al laboratori es van produir lleugeres modificacions tant pel que fa a certs reactius implicats a la PCR i reacció de seqüenciació com a l'aparellatge, amb la incorporació d'un nou seqüenciador automàtic de 4 capil·lars *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). El fet d'implementar una nova Taq, en concret l'EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen) implicà la utilització del tampó 10X PCR buffer de la nova casa comercial i 2 µl del seu MgCl₂ (50 mM) que es trobava doblement concentrat respecte a l'anterior. Les condicions per l'amplificació de la COI foren lleugerament diferents, consistint en un pas inicial de desnaturalització de 2' a 95°C, seguit per 35 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 54°C i 1' a 72°C, per últim, es realitzà un elongació final durant 10' a 72°C.

Així mateix, el procés de seqüenciació es va veure modificat, pel fet d'utilitzar un nou seqüenciador, en l'ús del *kit* de seqüenciació BigDye v.1.1 (Applied

Biosystems). Finalment, la resuspensió del producte seqüenciat es va realitzar amb 10 μ l de *Hi-Di* formamida (Applied Biosystems).

2.3. ANÀLISI DE DADES

Els cromatogrames (Figura 27), corresponents a les seqüències nucleotídiques obtingudes de cada marcador, foren alineats i editats amb el programa SeqEd (Applied Biosystems) un cop les seqüències foren processades amb l'ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) i foren alineats i editats amb el programa SeqScape (Applied Biosystems) quan les seqüències foren processades amb l'ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilitzant com a referència pels mugílids la seqüència completa de *Mugil cephalus* (GenBank accession no. AP002930; Miya et al., 2001) i pels aterínids la seqüència completa de *Melanotaenia lacustris* (GenBank accession no. AP004419; Miya et al., 2003).

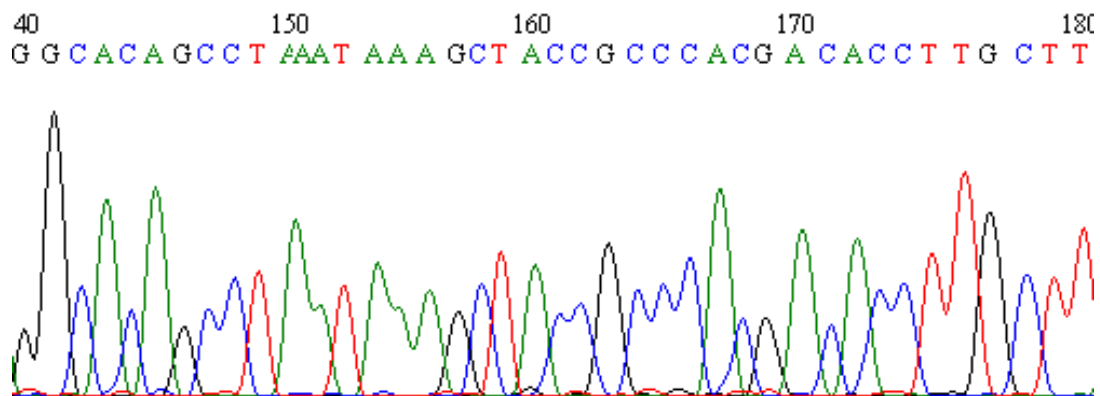
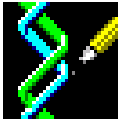


Figura 27. Cromatograma d'una seqüència pròpia de 12S rRNA de *M. cephalus*.

L'edició final dels alineaments es va realitzar amb el programa BioEdit (Hall, 1999) (Figura 28) amb el qual es poden observar fàcilment les zones conservades i les variables. El criteri d'alineament entre les seqüències fou: Transicions > Transversions > Gaps.



BioEdit.exe

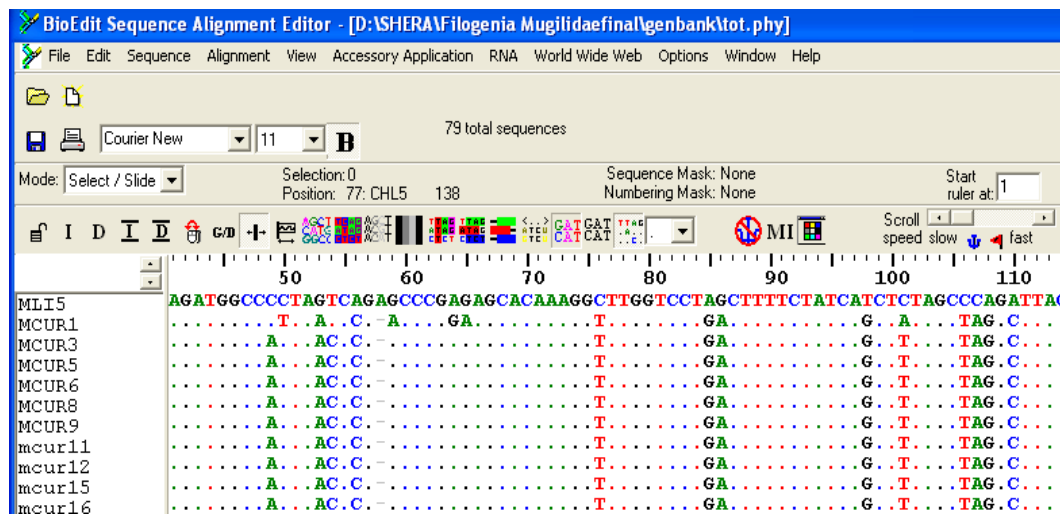


Figura 28. Interfície gràfica del programa BioEdit.

Cada seqüència diferent de cada marcador fou considerada un haplotip diferent mitjançant el programa DAMBE (Xia i Xie, 2001) (Figura 29) amb el qual també es va testar la saturació nucleotídica (Figura 30). En el cas de no detectar saturació esperariem trobar que les substitucions nucleotídiques observades dins del grup d'estudi, tant transicions com transversions, s'incrementin a mesura que augmenta la divergència haplotípica.



Dambe.exe

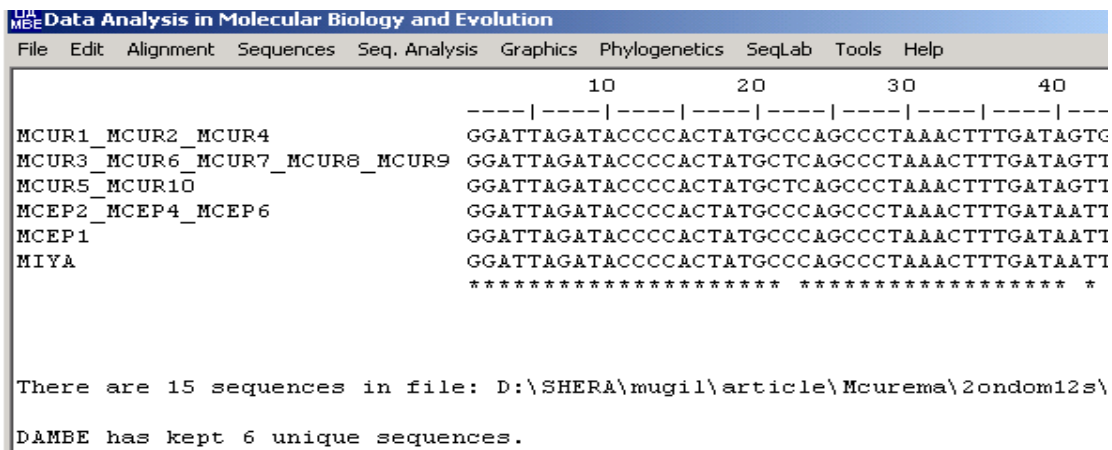


Figura 29. Interfície gràfica del programa DAMBE.

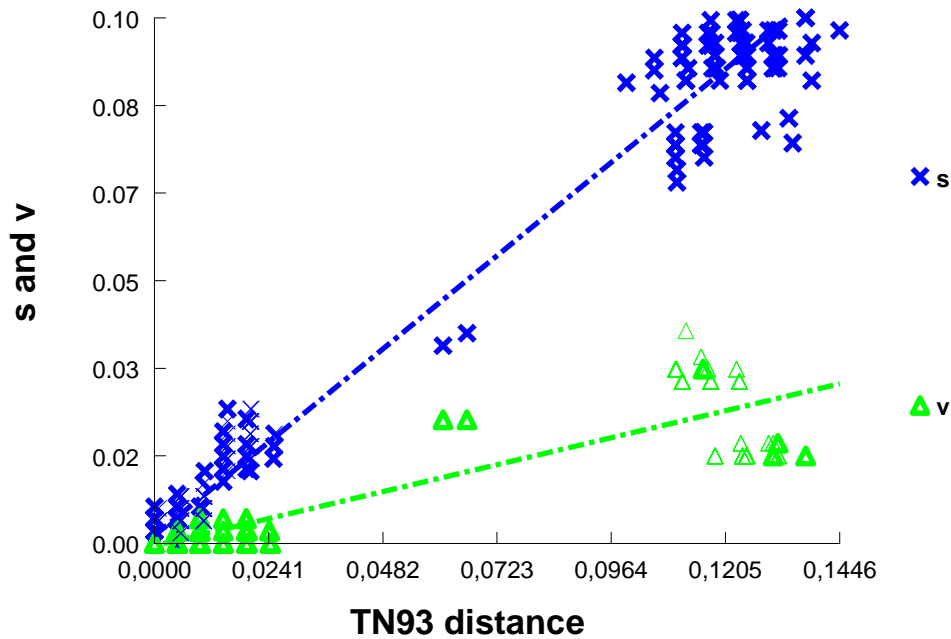
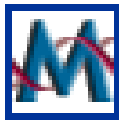


Figura 30. Gràfica de saturació del programa DAMBE.

La composició nucleotídica, les posicions variables i el càlcul de la distància genètica de Tamura-Nei (1993), utilitzada per comparar amb les distàncies de treballs prèviament publicats, foren determinats amb el programa MEGA (Kumar et al., 2004; Tamura et al., 2007) (Figura 31).



Mega4.exe

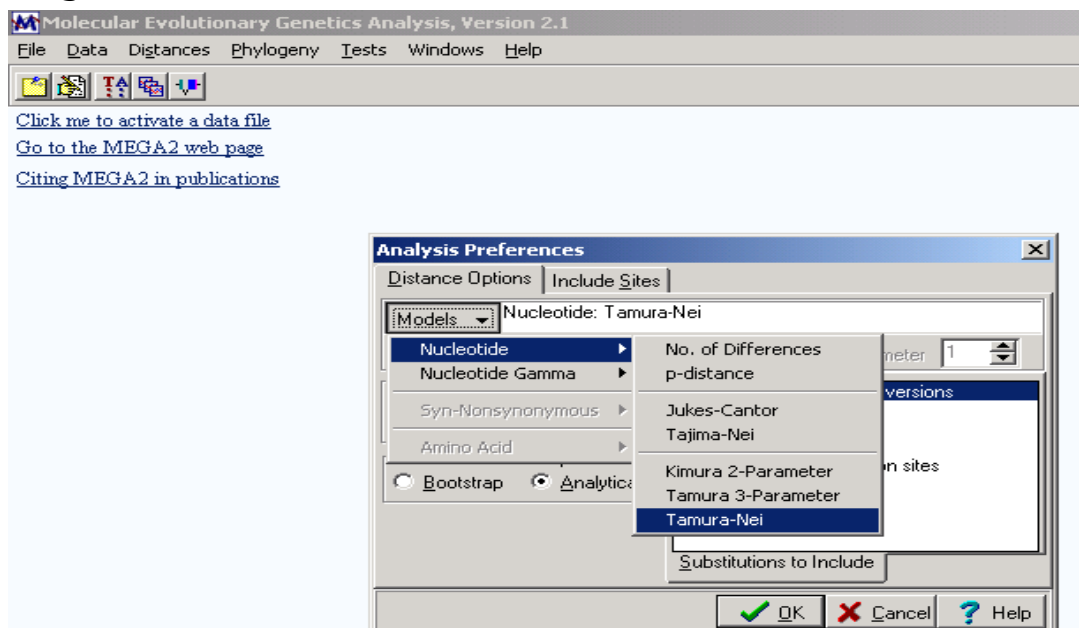


Figura 31. Interfície gràfica del programa MEGA.

Les relacions filogenètiques entre espècies foren inferides amb metodologies diferents utilitzant diversos programes informàtics:

1) Amb el programa MEGA es va calcular la distància genètica Tamura-Nei (1993) per cada parell de taxa i es va reconstruir l'arbre filogenètic amb l'algorisme de *Neighbor-Joining* (NJ; Saitou i Nei, 1987), basat en agrupar seqüencialment els veïns més pròxims, de forma que es minimitzi la longitud total de les branques de l'arbre.

2) Emprant el programa Modeltest (Posada i Crandall, 1998) es va inferir el model de substitució nucleotídica. Aquest model fou utilitzat pel programa PAUP* (Swofford, 2002) per realitzar:

2.1) una reconstrucció filogenètica amb el mètode NJ.

2.2) una anàlisi de Màxima Versemblança o *Maximum Likelihood* (ML; Fisher, 1921) amb la qual s'infereix l'arbre més probable que expliqui les dades sota un model evolutiu donat.

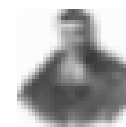


win-paup4b10.exe

3) Mitjançant el PAUP* es va fer l'anàlisi de Màxima Parsimònia (MP; Fitch, 1971), mètode que es basa en trobar l'arbre més curt, amb menys nombre de canvis o passos mutacionals entre els taxa.

La robustesa dels arbres generats en els tres casos anteriors fou testada usant l'anàlisi de bootstrap (Felsenstein, 1985) amb 1000 rèpliques.

4) Inferència bayesiana mitjançant el programa MrBayes (Ronquist i Huelsenbeck, 2003). En aquest cas, prèviament s'ha utilitzat MrModeltest (Nylander, 2004) per especificar-ne un model a priori. L'anàlisi bayesiana, que expressa el



Mrbayes.exe

resultat com la probabilitat del model donades unes dades, utilitza la tècnica de simulació de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) per aproximar la distribució posterior dels arbres ja que analíticament seria impossible. Finalment, el programa realitza un arbre consens de tots els arbres generats anteriorment amb els valors de probabilitat posterior o credibilitat dels seus clades.

3. RESULTATS

En relació amb els objectius plantejats (veure pàgina 57), en el present apartat s'han presentat els resultats obtinguts en format de quatre articles científics, tres publicats i un d'enviat a revistes indexades. Els articles es presenten en ordre cronològic de publicació, tanmateix, els dos primers treballs es van elaborar simultàniament. Desglossant els resultats en funció dels articles a on s'han publicat, trobem que el primer treball mostra la importància dels marcadors moleculars per a confirmar la detecció d'individus d'una espècie particular en noves localitzacions mai descrites prèviament com seria el cas de *M. curema*. Aquest article ens va revelar una inesperada i elevada divergència genètica entre dos llinatges de *M. curema*. Aquest fet ens va fer profunditzar sobre *M. curema* i desenvolupar el tercer treball per tal d'indagar la possible existència de més d'una espècie sota una mateixa nomenclatura.

El segon treball va tenir com a objectiu principal validar l'espècie *M. platanus*, que és considerada per alguns autors amb entitat taxonòmica pròpia i per d'altres com a una sinonímia de *M. cephalus*, com a una espècie amb un filogrup al·lopàtricament aïllat i genèticament diferenciat de *M. cephalus*. Aquest estudi ens va plantejar, en el tercer

treball, la necessitat d'incloure més mostres de *M. cephalus* de diferents localitats aïllades per tal de detectar si aquesta mateixa diferenciació també tindria lloc al llarg de la seva distribució mundial.

En el tercer article es van estudiar més localitats de *M. curema* i de *M. cephalus* per ampliar i anar més enllà dels dos treballs anteriors pel que fa referència a l'existència de més d'una espècie de *M. curema* i per l'aïllament geogràfic de diferents filogrups de *M. cephalus*, que a l'igual que *M. platanus*, podrien ser genèticament diferenciats. En aquesta ocasió, hi entra també en joc una tercera espècie del gènere *Mugil*, *M. liza*, de la qual no s'havia tingut cap mena de dubte sobre la seva consideració d'espècie veritable, i tres altres gèneres de la família Mugilidae, concretament, *Liza*, *Chelon* i *Oedalechilus* inferint-ne'n la filogènia. Se n'han pogut extreure implicacions taxonòmiques tant a nivell d'espècie com a nivell de gènere amb recomanacions per tal de millorar-ne'n la classificació biològica.

L'últim article aborda l'estudi de les relacions interespecífiques del gènere *Odontesthes* (Atheriniformes) i de les seves relacions amb altres Atheriniformes, així com de la seva proximitat evolutiva respecte a la sèrie Mugilomorpha.

3.1. Article I:

Heras, S., González Castro, M., Roldán, M.I., 2006. *Mugil curema* in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach. *Aquaculture* 261, 473-478.

Heras, S., González Castro, M., Roldán, M.I. “*Mugil curema* in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach”. *Aquaculture*. Vol. 261, issue 2 (Nov. 2006) : p. 473-478.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.003>

Laboratori d'Ictiologia Genètica, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Spain

Laboratorio de Ictiología, Departamento de Ciencias Marinas, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina

Received 13 October 2005; revised 3 July 2006; accepted 4 July 2006. Available online 8 July 2006.

Abstract

A previously unidentified mullet species (*Mugil* sp.) from Mar Chiquita lagoon, Argentina, was compared with two candidate species *Mugil curema* and *M. cephalus* using 12 truss landmarks and three mitochondrial DNA genes (12S rRNA, cytochrome *b* and COI). Both procedures confirmed that the Argentinean fish were white mullet *M. curema*. Morphological comparisons clearly segregated *M. curema* from *M. cephalus* samples in PCA plot. Similarly, Argentinean haplotypes at each gene overlapped with *M. curema* reference samples while *M. cephalus* haplotypes remained distinct. These combined data provide a valuable baseline for further investigations on the geographic distribution of this commercially important species group.

Keywords: *Mugil curema*; 12S rRNA; Cytochrome *b*; COI; Morphology; Landmarks

3.2. Article II:

González Castro, M., Heras, S., Cousseau, M.B., Roldán, M.I., 2008. Assessing species validity of *Mugil platanus* Günther, 1880 in relation to *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Actinopterygii). Italian Journal of Zoology 75, 319-325.

González Castro, M., Heras, S., Cousseau, M.B., Roldán, M.I. "Assessing species validity of *Mugil platanus* Günther, 1880 in relation to *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Actinopterygii)". *Italian Journal of Zoology*. Vol. 75, issue 3 (September 2008) : p. 319-325.

<http://dx.doi.org/10.1080/11250000801886254>

Laboratorio de Ictiología, Departamento de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC)

Laboratori d'Ictiologia Genètica, Universitat de Girona, Girona, Spain

Received 13 October 2005; revised 3 July 2006; accepted 4 July 2006. Available online 8 July 2006.

Abstract

Conservative morphological characters make identification of mullet species difficult. As a consequence, cosmopolitan distribution of *Mugil cephalus* is currently under discussion. In order to clarify the controversy regarding the taxonomic status of the southern Atlantic American mullet *M. platanus*, in relation to *Mugil cephalus*, a comprehensive analysis is presented using sequences of the mitochondrial gene cytochrome *b*, landmark-based morphometry and meristic data. The interlandmark distances showed differentiation between individuals of *M. platanus* and *M. cephalus* analyzed. Variables, representing the height at different levels of the longitudinal axis of the body, exposed that *M. platanus* has more robust middle and caudal segments of the body, in a lateral view, with respect to *M. cephalus*. Transversal series scales have not been useful for the identification of species. Lateral series scales seem to be useful to differentiate species, but taking into account that range showed an overlapped gradual variation. Genetic distance obtained between species shows a typical intrageneric level comparison. Two clear phylogroups have been detected indicating a high degree of genetic isolation between both species. Recognition of *M. platanus* as valid allopatric species is suggested.

Keywords: *Mugil platanus*; *Mugil cephalus*; landmarks; meristic; cytochrome *b*; taxonomy

3.3. Article III:

Heras, S., Roldán, M.I., González Castro, M., 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 217-231.

Heras, S., Roldán, M.I., González Castro, M. "Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised". *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol. 19, number 2 (June 2009) : p. 217-231.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11160-008-9100-3>

Universitat de Girona Laboratori d'Ictiologia Genètica, Facultat de Ciències Campus Montilivi, Girona, Spain

Universidad Nacional de Mar del Plata Laboratorio de Ictiología, Departamento de Ciencias Marinas, Mar del Plata, Argentina

Abstract

Systematics derived from morphological characters often does not correspond with the evolutionary processes underlying the divergence within a group of organisms. In the family Mugilidae (Teleostei) morphological similarities have resulted in inconsistencies between taxonomy and phylogeny among its species, and particularly for the genera *Mugil*, *Liza* and *Chelon* where both intrageneric and intergeneric phylogenetic clarifications are needed. To address these issues, the direct sequencing of the mitochondrial region that encodes Phenylalanine (69 bp), 12S rRNA (842 bp), cytochrome *c* oxidase subunit I (651 bp) and cytochrome *b* (702 bp) was carried out. The data reveal that *Mugil platanus* and *Mugil liza* represent a continuum of a single species, closely related to but distinct from *Mugil cephalus* which itself appears to comprise a grouping of multiple and closely related species. This species complex was genetically distinct from *Mugil curema*, which, based on three clearly diverged species identified in this study along the Atlantic coast of the Americas, requires extensive taxonomic revision throughout its world-wide distribution. Unlike the monophyly supported within *Mugil*, relationships within *Liza* are paraphyletic, and a taxonomic revision of the genera *Liza*, *Chelon* and *Oedalechilus* is needed.

Keywords: Phe; 12S rRNA; Cytochrome *b*; COI; Mugilidae phylogeny; Taxonomy

3.4. Article IV:

Heras, S., Roldán, M.I. First phylogenetic inference in *Odontesthes* (Pisces: Acanthopterygii) based on four mitochondrial genes. Zoological Journal of the Linnean Society (en revisió).

First phylogenetic inference in *Odontesthes* (Pisces: Acanthopterygii) based on four mitochondrial genes.

Sandra Heras, María Inés Roldán

Contributing author: S. Heras; Laboratori d'Ictiologia Genètica. Departament de Biologia. Universitat de Girona. Campus Montilivi, E-17071 Girona, Spain. E-mail: sandra.heras@udg.edu

Corresponding author: M. I. Roldán; Laboratori d'Ictiologia Genètica. Departament de Biologia. Universitat de Girona. Campus Montilivi, E-17071 Girona, Spain. Tel: +34.972.418961; Fax: +34.972.418277; E-mail: marina.roldan@udg.edu

Running title: Molecular phylogeny of *Odontesthes*

ABSTRACT

Systematic questions relating to fishes of the Atherinomorpha were examined through sequence data for four mitochondrial markers at different taxonomic levels. In the Atherinopsoidei (New World silversides) comparisons among five species of *Odontesthes* (2,794 bp) revealed weak differentiation between *O. argentinensis* and *O. bonariensis*, and the close grouping of *O. smitti* and *O. hatchery*, with *O. incisa* contained in the same phylogroup. In the Atherinoidei (Old World silversides) *Atherina boyeri* was corroborated as a polymorphic complex of three species. Abbreviated data (1,568 bp) supported *Odontesthes*, Atherinopsoidei, *Atherina*, Atherinoidei and Atherinomorpha as monophyletic taxa, and corroborated Atherinomorpha as the sister group of Mugilomorpha.

Keywords: 12S rRNA - COI - control region - cytochrome *b* - molecular phylogeny – Mugilomorpha - phenylalanine tRNA - proline tRNA – taxonomy - threonine tRNA.

4. DISCUSSIÓ

La natura i l'origen de les espècies és l'eix central de la biologia evolutiva per entendre els mecanismes i processos de l'evolució (Sites i Marshall, 2003). Durant els darrers 250 anys, el sistema jeràrquic de categories taxonòmiques, amb nomenclatura binomial linneana, ha servit als taxònoms per a classificar les espècies agrupant-les d'acord amb la seva similitud (Avisé i Johns, 1999). Així, les regles de la nomenclatura buscaven estabilitat i conceptes tipus per a un món a on les entitats eren immutables i no canviaven al llarg del temps (Mayden, 2002). Aquesta vella aproximació tipològica, amb la qual els taxònoms descriuen les espècies com a pures categories taxonòmiques, ha frustrat a molts biòlegs no taxònoms (Dayrat, 2005) ja que aquestes regles només haurien d'existir per anomenar, però no haurien de reflectir la nostra visió del món actual (Mayden, 2002). La sistemàtica moderna, però, ha incrementat significativament la seva activitat en la recerca per tal d'integrar-hi la biologia evolutiva (de Queiroz, 2005), organitzant, així, la informació biològica tot proporcionant-li un marc filogenètic (Kullander, 1999). D'aquesta forma es pot arribar a obtenir una equivalència entre les espècies de la taxonomia amb les espècies de la teoria evolutiva, facilitant la integració

de la història de la natura dins de la biologia (Ghiselin, 2002). Tanmateix, el gran problema de la sistemàtica contemporània és la definició d'espècie, amb la qual no hi ha un acord generalitzat, ja que és alhora un terme científic, una categoria filosòfica (entitat real o terme artificial de conveniència) i una unitat de treball pràctica per als taxònoms (Turner, 1999).

Actualment, els dos conceptes més utilitzats d'espècie són el concepte biològic d'espècie (BSC) i el concepte filogenètic d'espècie (PSC) (Taylor, 1999). En el BSC es dóna vital importància a l'aïllament reproductiu mitjançant diferents mecanismes (Mayr i Ashlock, 1991). Una de les crítiques principals d'aquest concepte és que existeix una dificultat pràctica en testar si formes en al·lopatria són espècies o no, és a dir, si estan aïllades reproductivament o no. A més, tot i que es produís hibridació entre dues formes al·lopàtriques al laboratori, no implicaria que aquesta es donés de forma natural entre elles (Turner, 1999) i, donat que la majoria d'especiacions tenen lloc en al·lopatria, tot i que en simpatria s'està comprovant que és més freqüent del que es pensava (Boughman, 2001; Boughman, 2002; Seehausen et al., 2008; Kazancioglu et al., 2009), el BSC, que únicament seria testable en espècies simpàtriques, només comptaria i seria efectiu per a una quantitat trivial de la diversitat biològica actual (Mayden, 2002). Alhora, val a dir que el BSC resulta un terme desafortunat a causa de l'adjectiu "biològic"; és com si fos l'única definició d'espècie veritable, per la qual cosa alguns autors han advocat pel seu canvi a concepte de Mayr o d'aïllament reproductiu (Turner, 1999; de Queiroz, 2005). En el PSC, la filogènia, com a patró de caràcters, pren el paper principal (Cracraft, 1989; de Queiroz i Donoghue, 1990). Totes les espècies són unitats filogenètiques que formen grups monofilètics reconeixibles en base a caràcters autapomòrfics que les separen d'altres espècies (Kullander, 1999; Stauffer et al., 2002). Aquest concepte aconsegueix diferenciar a dues poblacions que es troben en al·lopatria com a espècies diferents, resolent així la problemàtica del BSC. No obstant, se li critica que pot arribar a produir excessives subdivisions dins de les espècies (Turner, 1999).

A part del BSC i PSC un altre concepte que està guanyant terreny és el concepte evolutiu d'espècie (ESC) que emmarcaria als dos anteriors. El ESC es basa en els llinatges independents (Wiley, 1981), definició teòrica d'espècie, perquè l'espècie és el resultat o producte de l'evolució. Aquesta definició d'espècie té el problema que és un concepte no operatiu, no és pràctic. Tanmateix, la resta de conceptes estarien subrogats

de forma secundària al ESC perquè serien les eines o metodologies operatives, basades en diferents criteris de divergència que suportarien la hipòtesi d'aquests llinatges independents (Mayden, 2002). Així, l'espècie l'únic que ha de fer és evolucionar de forma separada d'altres llinatges i es rebutja la necessitat de les propietats intrínseques dels anteriors conceptes d'espècie (aïllament reproductiu, monofiletisme) sinó que es consideren com a aplicacions pràctiques per a inferir els límits de les espècies (de Queiroz, 2005). Per tant, la taxonomia ha de ser capaç de diagnosticar i descriure espècies amb algun concepte operacional i pràctic i, tot i que molts biòlegs han mostrat una gran predilecció pel BSC pel fet que existeix un consens que les espècies són poblacions reproductivament aïllades (Ghiselin, 2002), rarament l'aïllament reproductiu s'ha pogut testar directament, sinó que l'han inferit a partir de diferències en els trets morfològics, la majoria associats amb l'especialització alimentària (Turner, 1999). Per aquest motiu, Mayden (2002) considera que per testar la validesa d'una espècie s'han d'acabar avaluant els caràcters heretables capaços d'identificar-la com a un llinatge independent, apostant d'aquesta manera pel PSC.

La sistemàtica tradicional principalment ha utilitzat els caràcters morfològics per identificar els grups taxonòmics (Hendry et al., 2000a). Per tant, històricament, la morfologia ha jugat un paper molt important en la definició d'espècies de peixos, molts dels quals foren descrits en base a un o 2 espècimens, sobretot durant els segles XVIII i XIX (Kullander, 1999). Tanmateix, a la pràctica, algunes espècies són molt difícils de delinear ja que no tots els espècimens són idonis per a la identificació al nivell d'espècie pel seu pobre estat de conservació (Dayrat, 2005). A més, algunes claus morfològiques només són efectives per a un estadi particular de la vida, per la qual cosa molts individus no poden ser identificats (Hebert et al., 2003). Molts taxònoms han parat poca atenció als nous mètodes desenvolupats durant els últims anys (Dayrat, 2005) com, per exemple, els mètodes multivariats i geomètrics que ofereixen uns procediments més sofisticats per descriure diferències entre les espècies (Strauss i Bookstein, 1982; Corti i Crossetti, 1996). Alhora, s'ha de fer notori que pocs taxònoms poden críticament identificar més del 0.01% del total d'espècies. Llavors, si es manté la dependència del diagnòstic morfològic, es requereix una comunitat de 15.000 taxònoms en perpetuïtat per identificar la vida estimada de 15×10^6 espècies (Hebert et al., 2003). Tanmateix, l'ICZN només requereix la descripció de l'espècie acompanyada dels caràcters

diagnòstic perquè l'espècimen tipus hi és subordinat. Llavors, si les espècies es reconeixen en base als caràcters, resulta igual de lícit aplicar els *clusters*, que mitjançant els caràcters les diagnostiquen (Kullander, 1999). Amb tot, cal tenir en compte que la taxonomia basada en la morfologia no és l'estudi de la diversitat de la vida per se, sinó només de la diversitat morfològica (Dayrat, 2005). Per tant, a causa de la dominància dels atributs morfològics per la limitació de la percepció visual dels humans, la identificació de llinatges evolutivament independents i considerats com a espècies vàlides en base a trets alternatius als morfològics s'han anat descartant pels sistemàtics clàssics per no considerar-los com a reals a la Natura (Mayden, 2002). Així, si continuem mantenint aquest únic sistema a on només preval el que es pot percebre de forma fàcil i clara, tindrem una visió distorsionada del que realment està succeint al món (Ghiselin, 2002). Els científics han buscat descobrir i entendre els processos evolutius de l'origen, la distribució i manteniment de la biodiversitat (Beheregaray i Caccone, 2007). No obstant, un dels problemes principals en el món de la biologia de la conservació radica en què la detecció de la diversitat només es realitza en base a la informació morfològica. Aquest fet, provoca que, tot i que molts científics són cada vegada més conscients que la diversitat a nivells inferiors d'espècie està en perill per l'acció humana (Turner, 1999), només les espècies establertes en la taxonomia actual són considerades com a les unitats de la biodiversitat i de les polítiques de conservació (Carvalho i Hauser, 1999). Malauradament, aquesta aproximació tradicional ha subestimat a moltes espècies de peixos que, tot i ser diferents unitats reproductivament aïllades, presentaven una elevada similitud morfològica que fa que no es puguin diferenciar entre elles i es continuïn mantenint sota un mateix nom científic en la classificació biològica actual, passant a formar part, així, de les anomenades espècies críptiques (Knowlton, 1993; Taylor, 1999). Mentre que la conservació de plantes i invertebrats es realitza preservant els seus hàbitats, en el cas dels peixos no es pot actuar de la mateixa manera (Turner, 1999) perquè són fortament explotats en el seus ambients naturals per a consumir, com a esport o per a tenir-los de forma decorativa en aquaris (Froese, 1999). Per tant, el descobriment de la diversitat críptica amagada hauria d'incorporar-se dins dels programes de gestió i conservació (Trontelj i Fiser, 2009). A més, s'haurien de considerar com una prioritat en els esforços conservacionistes, ja que els diferents factors que han provocat una pèrdua de la biodiversitat, sobretot en els

últims 50 anys (alteracions d'hàbitat, canvi climàtic, sobreexplotació i invasió d'espècies exògenes), es preveu que continuïn augmentant de forma alarmant (Beheregaray i Caccone, 2007). Aquestes limitacions, inherents en els sistemes d'identificació basats en la morfologia, ens expressen la necessitat per a una nova aproximació al reconeixement dels taxons (Hebert et al., 2003).

Durant les últimes dècades, la sistemàtica i la taxonomia han experimentat un ressorgiment gràcies a l'avanç que ha proporcionat el desenvolupament de les tècniques genètiques per avaluar tant la validesa de les designacions taxonòmiques com el reconeixement d'espècies, perquè la divergència genètica entre els taxa ens proporciona una via per testar l'aïllament reproductiu de les poblacions (Turner, 1999), les relacions filogenètiques i els mecanismes d'especiació (Carvalho i Hauser, 1999; Hendry et al., 2000a; Barlow, 2002). A més, l'augment d'estudis basats en la diversitat genètica, que han revelat l'existència d'una gran quantitat d'espècies críptiques, ens indica que la inversió cap a una taxonomia basada també en el DNA és urgent per poder implementar un sistema que pugui assegurar que aquestes espècies, un cop descobertes, puguin ser descrites (Beheregaray i Caccone, 2007). Aquest increment en l'ús de les seqüències de DNA respecte als caràcters morfològics, per tant, ha resultat inevitable i resideix principalment en el fet de disposar d'un elevat nombre de caràcters inambigus (Scotland et al., 2003) i que, quan existeixen conflictes entre els dos criteris, només els caràcters moleculars emprats en la inferència filogenètica haurien demostrat ser independents, homòlegs, variables entre els taxa sota estudi i resistir l'homoplàsia indicant-nos la seva idoneïtat en els estudis evolutius (Freeman i Herron, 2004). El genoma mitocondrial (mtDNA) ha mostrat avantatges respecte al nuclear per la limitada exposició a la recombinació del seu model d'herència haploide que evita patrons de reticulació (Avice i Walker, 1999). La taxa de divergència de les seqüències del mtDNA són adients tant per a dinàmiques poblacionals recents al llarg del rang d'espècies (seqüències d'evolució ràpida) com per a estudiar relacions filogenètiques a nivells superiors (seqüències d'evolució lenta) (Hewitt, 2001). Conseqüentment, el mtDNA s'ha utilitzat extensament i amb èxit en treballs sistemàtics tant per a diagnosticar espècies com per a inferir les seves relacions filogenètiques (Normark et al., 1991).

Actualment, les filogènies construïdes amb dades moleculars no impliquen, però, l'abandonament dels criteris morfològics, són, en molts casos, complementàries,

recolzant-se mútuament quan els resultats són congruents. Alhora, cal tenir en compte que existeixen molts taxa o bé extingits o bé en perill d'extinció que només es coneixen per un nombre molt limitat d'espècimens preservats als museus. D'aquests espècimens és molt difícil d'extreure'n DNA i pot ser que mai tornin a ser col·lectats (Wiens, 2004). Per tant, tot i les moltes avantatges de les dades moleculars, és necessari continuar recopilant dades morfològiques addicionals. A més, si es vol fer una reconstrucció fidedigna de l'arbre de la vida (*Tree of Life*), és imprescindible la inclusió dels fòssils per tal d'esbrinar la seva relació evolutiva amb la resta de taxa tant vivents com extints (Wiens, 2004). La integració d'estudis morfològics i moleculars s'hauria d'encaminar cap a la disminució dels trets morfològics, és a dir, no basar-se en caràcters diagnòstic per sí sols, sinó que aquests caràcters s'haurien de disposar en un arbre filogenètic per tal d'obtenir només els que siguin més rigorosos i crítics dins d'una filogènia molecular (Scotland et al., 2003). A més, en la descripció de les espècies hi hauria d'haver evidències genètiques que acompanyessin l'holotip (Baker et al., 2003).

Totes aquestes possibles aproximacions que intenten construir una taxonomia integradora que es nodreixi de diferents estaments de la biologia ens manifesten la importància de combinar aproximacions multidisciplinars per poder capturar tota la complexitat de la Natura i, d'aquesta forma, ser més conseqüents amb el món que ens envolta avui dia.

4.1. FILOGÈNIA MUGILOMORPHA

El regne marí ocupa la major part de la superfície de la Terra i, tot i que proporciona grans recursos per a la humanitat, es fa molt difícil d'estudiar, motiu pel qual encara hi ha un pobre enteniment dels seus organismes (Hewitt, 2001) com, per exemple, dels mugílids.

Els membres de la família Mugilidae presenten entre ells una elevada similitud morfològica (Thomson, 1997). Aquest fet ha provocat conflictes a l'hora de relacionar les classificacions taxonòmiques basades en els caràcters morfològics tradicionals amb les seves relacions evolutives. Els mètodes moleculars han provat la seva utilitat en diferents aspectes de l'especiació marina (Colborn et al., 2001) així com en la identificació d'espècies a través d'un petit segment del genoma (Hebert et al., 2003) desenvolupant per aquesta via una taxonomia molecular aplicada (Baker et al., 2003). Així, gràcies a la inferència genètica presentada en aquest treball de tesi (Article I), s'ha pogut confirmar molecularment la presència de *M. curema* a la Laguna de Mar Chiquita, declarada Reserva Mundial de la Biosfera per la UNESCO al 1996 (Iribarne, 2001). La seva presència s'hi havia detectat prèviament de forma morfològica (González Castro et al., 2006) representant el registre més meridional mai descrit de la seva distribució geogràfica. Aquesta troballa, doncs, contribueix a una millora de la localització i seguiment d'aquest important recurs alimentari (FAO, 2007). En general, la pesca intensiva realitzada al llarg dels últims 50 anys ha incrementat la vulnerabilitat dels recursos pesquers per una possible sobreexplotació; dels 600 *stocks* pesquers monitoritzats al món, més del 75% es troben des de completament explotats fins a molt deprimits (FAO, 2005). A més, molt sovint, la identificació morfològica de molts peixos, en perill d'extinció o no, que arriben al mercat per a la seva venda és impossible, per la qual cosa, la capacitat de detecció resideix en la utilització d'un sistema que utilitzi el DNA (Hebert et al., 2003). Les anàlisis de seqüències de mtDNA són una eina molt poderosa perquè permeten la identificació dels peixos adults, les larves i els seus productes derivats (ous, gònades, *bottarga*). Aquest sistema permet, per tant, fer estudis de traçabilitat explorant l'origen de les mostres esbrinat si deriven d'una determinada espècie o d'una altra (Palumbi i Cipriano, 1998; Hebert et al., 2003). Alhora, l'ús de la genètica resulta molt útil en la gestió pesquera per a la sostenibilitat a

llarg termini millorant d'aquesta forma la conservació d'espècies amenaçades (Ward et al., 2005). Si s'ha de gestionar la biosfera i les seves reserves amb sentit, com la de Mar Chiquita, és essencial una comprensió de l'evolució de la seva diversitat genètica per tal de preparar-les per a esdeveniments futurs (Hewitt, 2001).

A part de la detecció mitjançant el mtDNA, també s'han pogut diagnosticar diverses espècies clarament diferenciades des d'una base molecular dins del taxó *M. curema* (Article III). D'aquesta forma s'han pogut establir: 1) el tipus genètic I de *M. curema*, anteriorment proposat per ser anomenat *M. gaimardianus* Desmarest, 1831 (nom desestimat per ICZN, 1994), que consta d'una dotació cromosòmica de $2n=48$ amb una distribució coneguda a aigües de Brasil i Veneçuela i que actualment s'ha descrit i proposat com a *M. rubrioculus* (Harrison, 2007); 2) el tipus genètic II de *M. curema*, a on s'adscriuria la *M. curema* detectada a l'Article I, i que es podria correspondre tant a la *M. curema* amb dotació cromosòmica $2n=28$ (LeGrande i Fitzsimons, 1976) com $2n=24$ (Nirchio i Cequea, 1998) com a un altre tipus de dotació, i que tindria una distribució a l'Atlàntic des de Carolina del Sud, passant pel Gol de Mèxic, fins a Mar del Plata, incloent la llacuna de Mar Chiquita, a Argentina; 3) i finalment, el tipus genètic III de *M. curema* (la primera descripció genètica d'aquesta espècie), que a l'igual que el tipus II podria tenir qualsevol de les dotacions proposades anteriorment, i que es distribuïria actualment en simpatria amb el tipus II al Golf de Mèxic, indicatiu inequívoc que serien dues espècies diferents perquè en simpatria BSC i PSC són equivalents (Knowlton, 2000). Amb aquesta aportació en l'estudi de *M. curema*, amb la qual s'ha produït una subestima de la seva diversitat específica pel fet que diferents espècies han compartit fins ara el mateix nom científic (Taylor, 1999), queden obertes noves interrogants de quants més tipus genètics i/o espècies podrien en realitat existir al llarg del rang de distribució de l'espècie actualment coneguda com a tal. Arribats a aquest punt, caldria apuntar a una reflexió ja que aquesta magnitud tan elevada de diferència genètica entre aquests tres llinatges no s'ha vist corresposta amb les anàlisis morfològiques realitzades fins a l'actualitat. Per tant, l'aplicació d'unes tècniques morfològiques més desenvolupades de la MG (veure pàgina 9) podrien arribar potser a resoldre aquesta incògnita i detectar una diferenciació morfològica fins ara mai detectada.

Un altre conflicte taxonòmic sorgit dins del gènere *Mugil* és el que fa referència a l'estatus taxonòmic de *M. platanus*, que o bé és considerada com a una espècie vàlida o bé com a sinonímia de *M. cephalus*. El fet que de *M. platanus*, distribuït des del sud de Brasil fins a Argentina, no n'existís cap holotipus i que *M. cephalus* tingués una distribució cosmopolita a excepció d'un *gap* a la costa atlàntica de Sud-amèrica ha provocat que hi hagués aquest conflicte entre diferents ictiòlegs (Menezes, 1983; Gilbert, 1993; Thomson, 1997; Cousseau et al., 2005).

En aquesta investigació (Article II), primerament es va comparar a *M. platanus* amb *M. cephalus* del Mediterrani, amb el qual no es podia induir a cap mena d'error perquè no existeix cap discussió ni conflicte entre els taxònoms de la seva identitat en aquestes aigües. Amb l'aplicació de la merística i d'anàlisis morfològiques més sofisticades, com la morfologia basada en *landmarks* i l'anàlisi multivariant, aquests taxons han mostrat certa diferenciació morfològica, però només ha resultat significativa després d'aplicar-hi un test estadístic. Tot i que el desenvolupament de la morfologia pugui arribar a mostrar certa divergència entre espècies conflictives, acostuma a ser gràcies als assajos moleculars amb els que s'acaba produint la corroboració (Taylor, 1999). Així, ha estat amb l'anàlisi del mtDNA que s'han pogut diferenciar inequívocament com a dues espècies vàlides en base als llinatges o filogrups en al·lopatría i a la seva distància genètica, congenèrica segons Johns i Avise (1998), amb la qual es pot inferir tant el seu aïllament reproductiu com la seva independència evolutiva (Bradley i Baker, 2001).

Entre *M. liza* i *M. cephalus* no existia ambigüïtat taxonòmica perquè ambdues es consideren com a espècies vàlides, diferenciant-se clarament entre elles amb el caràcter diagnòstic del nombre d'escates de la sèrie lateral (Cousseau et al., 2005). A més, el fet que tant *M. liza* com *M. cephalus* ocorrin parcialment en simpatria al Golf de Mèxic, al sud de Florida i a Veneçuela (Mefford, 1955; Ditty i Shaw, 1996; Harrison, 2002) i que fressin de forma solapada entre Octubre i Febrer (McDonough et al., 2003; Gallardo-Cabello i Ibáñez Aguirre, 2004; Hill, 2004; Ospina-Arango et al., 2008), coincidint amb l'entrada de vents del nord al golf, segurament, ha desembocat també en aquest reconeixement de *M. liza* com a espècie dins de l'àmbit científic. Tanmateix, en l'estudi genètic realitzat, ha sorprès la detecció d'una inesperada semblança molecular entre *M. liza* i *M. platanus* (Article III). Els haplotips compartits que posseeixen aquestes dues

taxa provoquen que les anàlisis filogenètiques les agrupin en un mateix filogrup (Mpl/Mli de la Figura 1 de l'Article III), fet que suggereix la possibilitat de l'existència de flux gènic entre elles. Per aquest motiu, *M. liza* i *M. platanus* s'haurien d'englobar dins de la mateixa espècie que s'hauria de tornar a definir per incloure la variabilitat intraespecífica que aportarien aquestes dues taxa alhora. En aquest cas, el nom taxonòmic es correspondria al de *M. liza*, perquè segons el principi de prioritat del ICZN va ser el primer que es va descriure dels dos, concretament per Valenciennes al 1836. Una resposta a l'ambient que provocaria diferències (mida, mètrica, etc.), probablement, expliqui la variabilitat d'aquest taxó que englobaria alhora a *M. platanus* i *M. liza*. Malgrat tot, *M. liza* i *M. platanus* podrien trobar-se en un estadi incipient d'especiació i arribar a ser considerades com a subespècies. Les subespècies serien poblacions d'espècies distingibles per un o més caràcters morfològics i que tenen una diferent distribució (Futuyma, 2005), en aquest cas adjacent; l'estat de Rio de Janeiro al Brasil fa de frontera virtual entre *M. platanus* distribuïda cap al sud i *M. liza* distribuïda cap al nord (Menezes, 1983; Cousseau et al., 2005). *M. liza* es reproduïx entre Maig i Agost a la badia de Sepetiba a l'estat de Rio de Janeiro (Jardim Albieri, 2009) i *M. platanus* ho fa entre Setembre i Novembre a la badia de Paranaguá (Pereira Esper et al., 2001) que és la localitat més septentrional del sud de Brasil de la qual es coneixen estudis de la seva fresa. Per tant, a la possible zona de contacte al sud de Brasil entre *M. liza* i *M. platanus*, ambdues consten d'èpoques de posta diferents. Cal mencionar que ja a Argentina, més meridional, a on només s'hi distribueix *M. platanus* (Cousseau et al., 2005) la fresa es produïx entre Juliol i Setembre (González Castro et al., 2009). Diferents poblacions de peixos es poden reconèixer i anar-se diferenciant progressivament tant a causa de les diferències en la seva ecologia com del seu cicle de vida (Taylor, 1999). Per tant, l'aïllament espacial o temporal en la posta, que forma part d'aquest cicle vital, pot contribuir en l'aïllament reproductiu de les poblacions (Taylor, 1999). Així doncs, aquest aïllament de *M. liza* i *M. platanus* en la fresa sumat a una distribució geogràfica en parapatria, fa que puguin arribar a esdevenir diferents espècies a llarg termini. Possiblement, l'aplicació de la regió control que estem desenvolupant actualment, marcador mitocondrial d'evolució ràpida, òptim per a l'estudi de dinàmiques poblacionals i divergències recents, ens podrà ajudar a dilucidar si aquesta hipòtesi és certa.

Al llarg dels últims anys, s'ha desenvolupat activament la descripció de noves espècies en la biologia marina gràcies al descobriment d'un gran nombre d'espècies críptiques (Ghiselin, 2002; Dayrat, 2005), algunes econòmicament importants (Knowlton, 1993), que fins ara es mantienien amagades a causa de l'estasi morfològica (Knowlton, 2000). En molts casos, el manteniment ecològic i morfològic de molts complexos d'espècies críptiques cosmopolites s'atribueix o bé a una especiació relativament recent (Beheregaray i Caccone, 2007) o bé a una selecció estabilitzadora a escala circumtropical, en resposta a un hàbitat homogeni com seria el d'un ambient marí relativament estable, que hauria mantingut un fenotip conservat en un grup d'espècies al llarg de l'evolució (Knowlton, 1993; Colborn et al., 2001). En moltes espècies cosmopolites, s'hi estan reconeixent diverses particions evolutives (Colborn et al., 2001) associades a taxa regionalment més restringits en la seva distribució del que es pensava anteriorment (Gómez et al., 2002). Llavors, la distribució tan àmplia de molts peixos costaners podria ser en realitat un artefacte, constituint a la pràctica més d'una única espècie implicada (Gill i Kemp, 2002). Per tant, l'àmplia distribució geogràfica de moltes espècies marines requereix una reavaluació tal i com seria el cas de *M. cephalus*, que tot i estar confinat en aigües costaneres i presentar una capacitat de dispersió limitada, es pugui distribuir globalment arreu del món (Heads, 2005). El gran obstacle amb la majoria dels peixos costaners cosmopolites és que no es poden diferenciar geogràficament en base als caràcters morfològics examinats, però això no significa que no puguin tractar-se d'espècies diferents (Gill i Kemp, 2002). A més, es dona la tendència entre els taxònoms d'assignar la possible variació geogràfica a la variabilitat intraespecífica més que no pas a la categoria d'espècie (Gill i Kemp, 2002). Tanmateix, l'abundància d'espècies críptiques existents en tots els grans grups i hàbitats marins ens indica que molta part de la biodiversitat roman sense detectar a causa de la manca de caràcters morfològics útils taxonòmicament (Knowlton, 1993). No obstant, moltes d'aquestes espècies críptiques han demostrat ser diferents genèticament i, en els últims anys, les anàlisis filogenètiques moleculars han revelat una gran diversitat al llarg d'un rang ampli d'organismes. Donat que les diferències entre aquestes espècies sovint es basen en pocs gens amb baix efecte fenotípic (Futuyma, 2005), les eines genètiques moleculars hi juguen un paper molt important en el seu reconeixement (Knowlton, 1993). L'anàlisi del mtDNA ha demostrat la seva idoneïtat en la detecció d'espècies

críptiques en organismes continentals (Ellis et al., 2006; Sanders et al., 2006; Lefébure et al., 2007), en peixos marins no cosmopolites (Bernardi i Goswami, 1997; Sandoval-Castillo et al., 2004), cosmopolites (Miya i Nishida, 1997) i cosmopolites costaners (Colborn et al., 2001; Kon et al., 2007).

En el cas de les diferents poblacions analitzades de *M. cephalus* d'arreu del món presentades en aquesta tesi (Article III), s'ha constatat una divergència genètica suficient per determinar que els llinatges o filogrups corresponents al Mediterrani (McepMed), a Galveston Bay (McepUSA), al Japó (McepJapan) i a Xile (McepPacif) constitueixen espècies diferents aïllades geogràficament (Article III; Figura 3). Alguns ictiòlegs advoquen que les formes geogràfiques que puguin ser diagnosticades diferencialment haurien de tenir el reconeixement d'espècies vàlides (Gill, 2002). En els peixos, la subdivisió en poblacions acostuma a ser resultat d'esdeveniment vicariants, juntament amb una capacitat de dispersió limitada i la fidelitat a les àrees de naixement (Sandoval-Castillo et al., 2004). En la majoria de vertebrats l'especiació al·lopàtrica és la més habitual i la divergència evolutiva necessària per al reconeixement d'espècie està precedida per la diferenciació d'aquestes poblacions (Avise et al., 1998). Per aquest motiu, les poblacions aïllades geogràficament són de considerable interès perquè la manca de flux genètic és indispensable per aquest tipus d'especiació (Price, 1996). Aquest fet implica que, a l'igual que anteriorment amb els tres llinatges clarament diferenciats corresponents a tres espècies dins de *M. curema*, ens trobem, en aquest cas, davant d'un complex d'espècies críptiques a *M. cephalus*. És a dir, grups independents els uns dels altres que apareixien com a membres de la mateixa espècie per haver-se basat en la seva similitud morfològica, però que s'han pogut diagnosticar genèticament (Futuyma, 2005). Dins d'aquest mateix complex s'hi ubicaria el filogrup constituït pel redefinit *M. liza* (haplogrup Mpl/Mli), que comparteix el mateix ancestre que la resta de membres definits per *M. cephalus*, però consta del seu propi llinatge independent mantenint així la seva pròpia identitat (Mayden, 2002). L'ocurrència en grups filogenèticament diferenciats ens indica la baixa habilitat de dispersió dels membres d'aquest complex d'espècies i que es podrien trobar aïllats reproductivament (Ghiselin, 2002). Segons el mètode empíric per a diagnosticar espècies amb dades haplotípiques *CHA* (*cladistic haplotype aggregation*) de Sites i Marshall (2003), l'aïllament dels diferents llinatges d'haplotips en monofília detectats en l'estudi del complex *M. cephalus* es podrien

designar a diferents espècies. A més, val a dir també que segons Avise i Walker (2000) les genealogies realitzades amb el mtDNA fan que el PSC i el BSC tendeixin a convergir. L'anàlisi del mtDNA assisteix en el diagnòstic de les espècies críptiques perquè existeix una concordança raonable, dins d'un ordre de magnitud, entre el nombre de *clusters* filogenètics provinents dels seus gens amb el nombre d'espècies taxonòmiques actuals. De les 72 espècies de peixos analitzades per Avise i Walker (1999), només una presentava més de tres filogrups, valor molt inferior al de la resta dels grans grups de vertebrats de l'estudi. Per altra banda, seguint els preceptes de Knowlton (2000), el PSC, basat en múltiples marcadors, és compatible amb el BSC perquè les barreres reproductives emergiran durant el llarg període d'aïllament geogràfic que es requereix per a molts loci per adquirir diferenciacions diagnosticables. Així, a part dels diferents marcadors mitocondrials analitzats en el present estudi, també existeixen altres loci, com els nuclears mitjançant l'anàlisi d'al·lozims (Rossi et al., 1998a), que han demostrat la divergència entre diferents poblacions de *M. cephalus* a nivell mundial i que aporten aquesta visió d'anàlisi multigènica (Hewitt, 2001).

Alguns poden argumentar que tot i que sigui dins d'un ordre de magnitud, el fet és que el nombre d'espècies dins de *M. cephalus* augmenti molt. Però, fins ara ha existit una gran arbitrarietat en el límit superior d'espècies biològiques dins d'un taxó (Taylor, 1999) ja que, per exemple, per què a la *Drosophila* de Hawaii existeixen més de 800 espècies diferents?

Segons el *Crypticness Index* (CI) de Kon et al. (2007) exposat aquí:

$$CI = (Nc+Nk)/Nk$$

a on

Nc = nombre d'espècies críptiques trobades = llinatges McepMed, McepUSA, McepJapan, McepPacif, Mpl/Mli = **5**

i

Nk = nombre d'espècies anteriorment conegudes al complex d'espècies = *M. cephalus* i *M. liza* = **2**

obtenim

$$CI = (5+2)/2 = 3.5$$

El valor obtingut de 3.5 per al nostre complex d'espècies cau dins del rang de CI en complexos d'espècies críptiques de peixos que és entre 2 i 7 (Kon et al., 2007) per la qual cosa, els nostres resultats no s'allunyarien del que acostuma a ser ja habitual pel que fa al reconeixement de noves espècies en l'àmbit marí. A més, les distàncies genètiques detectades en el cytb entre els diferents filogrupos (0.0406-0.0586) cauen dins dels valors estimats per Johns i Avise (1999) per a llinatges de peixos corresponents a espècies diferents. Alhora, aquest rang de valors també s'ajusta als mostrats entre les diferents espècies críptiques del complex detectat dins del peix teleosti cosmopolita i costaner *Albula vulpes* (0.029-0.044) (Colborn et al., 2001). En el cas de la COI, trobem que els nostres valors de distància genètica (0.0229-0.0420) gairebé s'ajustarien als valors més freqüents per a espècies congenèriques de peixos (0.035-0.040 (Ward, 2009). Així mateix, la detecció d'una elevada variabilitat dins de cadascun dels diferents nivells jeràrquics dels peixos analitzats, en comparació amb d'altres grups de vertebrats, apunta a la pràctica d'una taxonomia inadequada duta a terme al llarg de tots aquests anys pel fet de no haver reconegut a moltes espècies críptiques dins d'aquest grup (Ward, 2009). Per aquest motiu, es fa necessària l'aplicació del DNA en els casos on la morfologia és tan conservada com és el cas de les espècies críptiques.

Donat que cariotípicament *M. platanus*, *M. liza* i *M. cephalus* són indistingibles, consten de 48 cromosomes acrocèntriques (Crosetti, 1993; Rossi et al., 1996; Nirchio et al., 2001), fet que hagués aportat una assignació inequívoca de noves espècies (Mayr i Ashlock, 1991), i a l'espera d'estudis d'entrecruaments entre els taxons implicats per tal de detectar-ne'n l'aïllament reproductiu, s'haurien de mantenir les propostes derivades del concepte filogenètic d'espècie exposades en aquest estudi perquè tot l'esforç per a conservar la biodiversitat, sense subestimar-ne'n el nombre d'espècies, ha de ser la màxima prioritat per no perdre patrimoni genètic i aconseguir una adequada gestió ambiental i de conservació (Agapow et al., 2004). Un dels grans entrebancs a l'hora de conservar és que l'espècie es considera de més importància i menys reemplaçable que el d'un complex de diferents varietats geogràfiques o poblacions

(Taylor, 1999). Aquest prejudici ha contribuït en la poc encertada pràctica de la translocació de peixos erròniament considerats extensament distribuïts (Gill i Kemp, 2002). Fins ara, també s'assumia que les espècies cosmopolites havien de tenir una capacitat de dispersió elevada i que les poblacions locals podrien recobrir les àrees deprimides del rang de distribució global, però els estudis de dispersió larval han demostrat que aquesta capacitat era molt inferior al que es pensava (Gill i Kemp, 2002). Una altra dificultat en la gestió de la diversitat biològica, en particular de les espècies costaneres, és la delimitació dels estocs pesquers en funció de les fronteres polítiques ja que, normalment, les decisions es prenen sense acabar de tenir en compte les opinions provinents del món científic (Gill i Kemp, 2002). De forma inqüestionable, hem comprovat com la biodiversitat críptica existeix, però que la poca comprensió sistemàtica dels peixos cosmopolites costaners fa que aquesta s'estigui subestimant. Les tècniques moleculars han pogut identificar els llinatges independents, potencial genètic màxim per als canvis evolutius futurs, com a espècies actuant, així, en la reavaluació de les espècies cosmopolites (Mayden, 2002). Per aquest motiu, resulta apropiat que a més dels procediments taxonòmics estàndards, la descripció de les espècies en base al DNA sigui necessària per als taxa morfològicament indistingibles (Kon, 2007) per a poder incloure així a totes les espècies críptiques que romanen encara per descobrir. Així, el reconeixement de noves espècies a on prèviament només se'n reconeixia una significarà l'adopció d'una nova visió del món biològic (Wiley, 2002), però conseqüent amb l'evolució.

En un altre ordre d'anàlisis, la genètica ha contribuït en examinar la validesa de la designació de les espècies en grups particulars (Hendry et al., 2000a). D'aquesta forma, últimament, alguns estudis filogenètics han revelat com molts taxa superiors tradicionalment reconeguts han resultat no ser monofilètics, com per exemple dins de la Classe Pisces (Wiens, 2004). Pel que fa referència als diferents gèneres analitzats dins de la família Mugilidae, *Mugil*, *Liza* i *Chelon* (Article III), aquests han mostrat resultats diversos. Les anàlisis filogenètiques han verificat el monofiletisme de *Mugil* perquè inclou a tots els membres estudiats d'aquest gènere i al seu ancestre comú més recent. En canvi, *Liza* ha resultat ser un gènere parafilètic. És a dir, l'ancestre comú més recent de totes les espècies del gènere *Liza*, analitzades molecularment, també ho és alhora de les espècies estudiades del gènere *Chelon* i *Oedalechilus*. Per tant, el gènere *Liza*, tal i

com estaria descrit en la classificació taxonòmica actual, inclouria a l'ancestre comú més recent però no a tots els seus descendents. Per tant, caldria adscriure als membres de *Liza* Jordan i Swain, 1884, *Chelon* Artedi, 1793 i *Oedalechilus* Fowler, 1903 sota una mateixa categoria taxonòmica per haver mostrat aquesta estreta relació entre ells (Futuyma, 2005). Segons el principi de prioritat del ICZN, aquestes espècies s'haurien d'incloure dins del gènere *Chelon* Artedi, 1793 que hauria de tornar a ser descrit per tal de poder-hi englobar la variabilitat morfològica aportada per part de totes les seves espècies.

Les classificacions errònies per part de la morfologia queden demostrades en l'estudi realitzat per Jablonski i Finarelli (2009), en el qual, la incongruència entre els morfogèneres, és a dir, grups morfològicament definits i els grups molecularment monofilètics és gairebé del 40% en mamífers, grup que consta de 5.416 espècies (Wilson i Reeder, 2005). Si de les gairebé 25.000 espècies descrites a Teleostei (Nelson, 2006), només s'han examinat directament unes poques desenes de taxa enfocant-se en la monofília (de Pinna, 1999), és fàcilment extrapol·lable que en aquest grup de peixos el percentatge de grups no monofilètics pugui ser molt superior a l'anterior. No obstant, a mesura que es vagin aportant noves dades moleculars, el nombre de morfogèneres confirmats o rebutjats en la classificació taxonòmica dels peixos podrà anar augmentant.

4.2. FILOGÈNIA ATHERINOMORPHA

Dins de la família Atherinopsidae o aterínids del Nou Món (subordre Atherinopsoidei), *Odontesthes* és un dels gèneres més importants tant des del punt de vista econòmic, perquè és un recurs important per a les pesqueries al Brasil, Uruguai i Argentina (Dyer, 2003), com en quant a representatiu en el nombre d'espècies, sent el gènere amb més espècies reconegudes a Sud-amèrica (Dyer, 1997). Segons Froese (1999) es necessiten urgentment treballs de revisió i catàlegs d'identificació pels peixos de Sud-amèrica, sobretot els d'aigua dolça, però, malgrat tot, s'han dut a terme escassos estudis genètics de les seves espècies d'*Odontesthes* i no existeix cap estudi, fins a l'actualitat, sobre la seva sistemàtica molecular.

Concretament, d'*O. smitti* i d'*O. incisa*, el treball presentat en aquesta tesi (Article IV) aporta les primeres dades genètiques conegudes d'aquestes dues espècies. A més, aquest seria el primer estudi filogenètic realitzat amb dades moleculars que inclouria a les dues espècies d'aigua dolça *O. bonariensis* i *O. hatcheri*. En aquest estudi s'ha presentat la seva primera filogènia molecular, corroborant-los com un grup monofilètic (7 caràcters morfològics diagnòstic indicaven el monofiletisme per aquest gènere; Dyer, 2006). En el nostre cas, a diferència dels estudis morfològics anteriors (Dyer, 1997), *O. hatcheri* no apareix com a el taxó germà de tots els *Odontesthes*, sinó que s'agrupa robustament amb *O. smitti*. No obstant, cal tenir en compte que Dyer (1997) utilitzà caràcters anatòmics i la taxonomia basada en aquests caràcters no acaba de ser definitiva en *Odontesthes* per l'elevada semblança morfològica de les seves espècies (Beheregaray i Levy, 2000).

L'espècie d'*Odontesthes* més àmpliament estudiada, inclòs genèticament, és *O. argentinensis*. D'aquesta espècie s'ha hipotetitzat, en base a anàlisis morfològiques i moleculars, que podrien existir-hi espècies incipients que es correspondrien a la seva forma llacunal i marina (Beheregaray i Levy, 2000; Bemvenuti, 2000; Beheregaray i Sunnucks, 2001). A més, aquestes dues formes difereixen en el període i llocs de posta a l'igual que la preferència d'hàbitats, el que implica una divergència ecològica (Beheregaray i Levy, 2000). Aquesta separació temporal i espacial del cicle de vida hauria de ser suficient per a poder crear un o varis mecanismes d'aïllament reproductiu complet entre aquestes dues formes d'*O. argentinensis* (Turner, 1999). A més, també

difereixen en la morfologia coriònica, caràcter usat per a diferenciar espècies d'Atheriniformes, i en la seva fisiologia (Beheregaray i Sunnucks, 2001). A l'igual que l'estudi realitzat al Brasil per Beheregaray i Levy (2000), a on no es coneixien barreres geogràfiques que separessin la forma estuarial de la llacuna de Dos Patos amb la forma marina, no existeix tampoc cap barrera entre la llacuna de Mar Chiquita i l'oceà Atlàntic a Argentina, d'on procedeixen les mostres analitzades en aquest treball. No obstant, el fet que els haplotips provinents de la possible forma estuarial (Oarg2 i Oarg3 de la Figura 1 de l'Article IV) sempre s'agrupin diferencialment respecte a l'haplotip de la forma marina (Oarg1) ens evidencia un flux gènic reduït (Sites i Marshall, 2003) d'aquestes dues poblacions d'*O. argentinensis* provinents d'ambients diferents. Tanmateix, el limitat nombre tant de mostres poblacionals com d'haplotips i les distàncies genètiques de nivells intraespecífics del nostre estudi no ens permeten agosarar-nos a inferir-hi espècies diferents. Malgrat tot, els colls d'ampolla o efectes fundadors haurien pogut provocar la diferenciació de les poblacions d'*O. argentinensis* estuarials, provinents d'una població marina ancestral (Beheregaray i Levy, 2000), provocant així el possible inici d'una especiació ecològica (Beheregaray et al., 2002). Per tant, actualment, les poblacions d'*O. argentinensis* de Mar Chiquita podrien tractar-se d'espècies ecològiques incipients. Aquests tipus d'espècies, resulten un referent molt important per a estudis de selecció adaptativa divergent associada a l'aïllament reproductiu (Beheregaray i Sunnucks, 2001), per la qual cosa la seva preservació és inestimable. Des d'aquest punt de vista, les poblacions marines i les estuarials haurien de ser tingudes en compte de forma separada a l'hora de realitzar polítiques de gestió pesquera i de conservació (Beheregaray i Sunnucks, 2001).

En general, la distàncies genètiques entre les espècies d'*Odontesthes* pels diferents marcadors mitocondrials (Article IV) han resultat ser relativament baixes en comparació amb les distàncies detectades entre les diferents espècies del gènere *Atherina* estudiades, pertanyent al mateix ordre, la qual cosa ens podria indicar que aquest gènere ha divergit de forma relativament recent com és el cas dels peixos cíclids al llac Victòria (Awise i Walker, 2000). A més, les distàncies entre les diferents espècies d'*Odontesthes* per la COI, caurien dins dels valors més freqüents entre peixos del mateix gènere (Ward, 2009). Així mateix, l'ocurrència en simpatria de les tres espècies marines, *O. argentinensis*, *O. smitti* i *O. incisa*, les quals apareixen en filogrups

clarament diferenciats, ens indicaria un molt probable aïllament reproductiu entre elles (Knowlton, 2000). Els valors de distància genètica més baixos, per a tots els marcadors analitzats, la trobem entre *O. argentinensis* (aigua salobre) – *O. bonariensis* (aigua dolça) i entre *O. smitti* (aigua salobre) – *O. hatcheri* (aigua dolça). Tot i que aquestes dues parelles d'espècies exhibeixen baixos nivells de diferenciació genètica, també poden trobar-se en un estat d'aïllament reproductiu entre elles (Knowlton, 2000). Llavors, l'estreta relació mostrada a les anàlisis filogenètiques i les distàncies genètiques mínimes, de nivells intraespecífics, de les espècies anteriorment mencionades, ens faria parlar d'espècies incipients que han divergit molt recentment. Així doncs, l'espècie d'aigua dolça *O. bonariensis*, però peix eurihalí (Dyer, 2006), podria ser el producte de l'especiació de poblacions ancestrals d'*O. argentinensis* que emigraren de l'àmbit marí al d'aigua dolça (Tejedor, 2001). L'efecte fundador en hàbitats d'aigua dolça emergents en àrees costaneres per formes marines ancestrals també seria el cas d'altres espècies com el peix *Gasterosteus aculeatus* a on hi trobem tres ecotips diferents, el marí, el d'estuari i el d'aigua dolça (Taylor, 1999) i, de forma més propera, al complex *O. perugiae* amb una forma lacustre i l'altra de ribera (Beheregaray i Sunnucks, 2000; Beheregaray et al., 2002). Treballs experimentals que poguessin demostrar l'especiació a la Natura han sigut considerats impracticables en temps real a causa de l'assumpció d'un llarg període d'aïllament necessari. Tanmateix, Hendry et al. (2000b) van demostrar com l'aïllament reproductiu pot evolucionar de forma ràpida quan es colonitzen ambients nous i diferents. En aquell treball, es va detectar un aïllament reproductiu en tan sols 13 generacions entre les dues poblacions d'*Oncorhynchus nerka* (salmó del Pacífic) provinents d'una font comú de reproductors d'aigua dolça i introduïda en ambients diferents (costaner-marí i riu), fet que representa un període evolutiu curt de només 56 anys.

Els peixos aterínids mostren una gran habilitat per envair i especiar dins de nínxols d'aigua dolça vacants (Bamber i Henderson, 1988) com el de la Laguna de Gómez, d'on prové la nostra mostra d'*O. bonariensis*, i que té una connexió cap al mar a través del Río Salado, davant de les costes argentines a on hi trobaríem *O. argentinensis*. A l'igual que el complex d'espècies *O. perugiae*, que ha radiat recentment a partir d'un ancestre marí compartit amb *O. argentinensis* (Beheregaray i Sunnucks, 2000), *O. bonariensis* s'hauria originat també recentment a partir d'aquest

ancestre, que actualment estaria representat en la seva forma marina per *O. argentinensis*. Per tant, la diversificació dels *Odontesthes* és deguda a que el seu ancestre marí-estuarial, amb molta variabilitat genètica, els preadapta per a poder colonitzar i especiar de forma ràpida en nous ambients (Cognetti i Maltagliati, 2000; Beheregaray et al., 2002). La colonització de nous ambients estuarials, amb condicions físico-químiques i factors biològics molt inestables, podria haver afavorit una ràpida adaptació i aïllament reproductiu per selecció natural (Bilton et al., 2002). Els valors de bootstrap presentats per l'agrupament d'*O. bonariensis* són moderats, al voltant del 75%. Aquesta dada també podria ser un reflex de la seva especiació recent perquè *O. bonariensis* i *O. argentinensis* presentarien una baixa divergència entre elles, com així s'ha observat, que causaria una baixa senyal filogenètica en els arbres realitzats amb mtDNA (Funk i Omland, 2003). El mtDNA pot ser que encara no contingui la variabilitat genètica suficient per detectar les radiacions filogenètiques recents, donat això, no pot acabar de segregar les dues espècies derivades de l'ancestre comú com a recíprocament monofilètiques, per la qual cosa es podrien presentar fins i tot patrons parafilètics (Funk i Omland, 2003). Tot i que amb l'anàlisi realitzada hem detectat que *O. argentinensis* i *O. bonariensis* són recíprocament monofilètics, seria interessant confirmar aquests resultats amb l'anàlisi de dades nuclears, tal i com es va realitzar en una comparativa entre la regió control i els microsatèl·lits de les espècies recentment radiades del grup *O. perugiae* (Beheregaray et al., 2002).

De la mateixa manera que *O. argentinensis* i *O. bonariensis*, *O. smitti* (marí) i *O. hatcheri* (peix patagònic d'aigua dolça) apareixen junts en la mateixa agrupació (Article IV). Segons Bamber i Henderson (1988), la majoria dels peixos d'aigua dolça de la Patagònia també s'haurien originat principalment d'immigrants marins. Els Andes separen la distribució dels *Basilichthys* a l'oest (peixos d'aigua dolça de la mateixa família) dels *Odontesthes* a l'est (Dyer, 1998). L'elevació d'aquest sistema muntanyenc s'especula que fou cap a finals del Miocè (fa 5.3 milions d'anys) i fins a l'època del Pleistocè-Holocè (1.8 milions-10.000 anys) hi va haver un mar a la plataforma continental proper a la costa (*Paranense Sea*; Dyer, 1998). Per tant, *O. hatcheri* hauria pogut divergir just abans que baixés el nivell del mar fins a l'actualment conegut en aquella zona, és a dir, just abans d'aquest període de canvi climàtic. El que hem estat observant doncs a *Odontesthes*, és que se suggereix un patró de parelles d'espècies, una

espècie marina amb una d'aigua dolça. Per tant, per *O. incisa* (marina) també esperariem trobar la seva corresponent parella d'aigua dolça en quant es poguessin analitzar la resta d'espècies d'*Odontesthes*. Així, la segregació vicariant d'espècie marina – espècie d'aigua dolça podria ser el resultat tant de la tectònica de plaques com dels canvis del nivell del mar, associats amb els intervals glacials, que haurien originat la major part de la variabilitat en les espècies marines de l'oceà Atlàntic (Colborn et al., 2001) i que, per tant, hauria configurat tant la història evolutiva com la distribució actual de les espècies d'*Odontesthes*. Concretament, els canvis del nivell del mar durant el Pleistocè-Holocè haurien pogut originar els llinatges derivats del mar a Sud-amèrica que concordarien amb la recent radiació dels *Odontesthes* (Lovejoy et al., 2006). Donat que la detecció de patrons d'especiació vicariant en els peixos marins és molt difícil per la manca de suficients anàlisis filogenètiques (Wiley, 2002), la filogènia dels *Odontesthes* ofereix una gran oportunitat per a l'estudi dels processos biogeogràfics a Sud-amèrica (Sunnucks et al., 2000).

Per altra banda, també s'ha pogut testar, amb els marcadors moleculars, la classificació de la família Atherinopsidae a la qual pertany *Odontesthes*. Amb l'anàlisi filogenètica realitzada incloent diferents espècies disponibles al GenBank (Article IV; Taula 1, Figura 2), s'ha corroborat el monofiletisme, detectat prèviament per Dyer i Chernoff (1996) en base a 20 caràcters morfològics, de la família Atherinopsidae (constituïda per les subfamílies Atherinopsinae amb *Odontesthes* i Menidiinae amb *Menidia*) amb un 100% de robustesa. De retruc, també s'ha corroborat el monofiletisme del subordre Atherinopsoidei, ja que la família Atherinopsidae és l'única que el constitueix.

Dins de la família Atherinidae o aterínids del Vell Món (subordre Atherinoidei), el gènere *Atherina* és reconegut al Mediterrani sobretot per l'interès comercial de les espècies *A. boyeri* i *A. hepsetus* (de Sostoa et al., 1990; Pallaoro et al., 2007). Per *A. boyeri*, s'ha proposat que estaria constituït per un complex de tres espècies que explotarien nínxols ecològics d'ambients diferents (Trabelsi et al., 2000a, b; Francisco et al., 2008; Milana et al., 2008). Així, estaríem parlant de 1) *A. boyeri* que continuaria mantenint el seu nom i seria la forma exclusivament marina i sense presència de taques; 2) *A. punctata* que seria també una forma marina, només distribuïda al Mediterrani occidental (Milana et al., 2008) i amb un patró de taques fosques al llarg de la seva línia

lateral, i 3) *A. lagunae* que seria la forma llacunal/estuarial. Aquesta proposta s'ha vist confirmada pels nostres resultats ja que, dins d'*A. boyeri*, s'hi ha mostrat una clara divergència entre els tres morfoecotips dels que consta aquest complex; fins i tot, les distàncies genètiques han resultat ser superiors a les detectades entre dues espècies vàlides i ben establertes com són *A. hepsetus* i *A. presbyter*. D'aquesta forma, es confirma una especiació probablement ecològica causada per l'aïllament que ha actuat sobre les poblacions que exploten nínxols (Taylor, 1999) o ambients de salinitat diferents (Cognetti i Maltagliati, 2000). Gràcies a la plasticitat dels aterínids, que implicaria una selecció dels genotips generalistes per poder aguantar un rang ampli de condicions (Beheregaray i Sunnucks, 2001), l'ancestre d'*A. boyeri* es va poder preadaptar per radiar de forma repetida cap a hàbitats vacants colonitzant, així, estuaris, llacunes i adquirint també l'habilitat per poder envair espais d'aigua dolça (Bamber i Henderson, 1988). Així, aquesta variació específica (merística, mida, estructures morfològiques particulars, etc.) d'algunes espècies en resposta a l'ambient (Bamber i Henderson, 1988; Cognetti i Maltagliati, 2000) és el que hauria originat aquest complex d'espècies a *A. boyeri*.

Per altra banda, trobem que la família Melanotaeniidae també està inclosa dins del subordre anterior (Atherinoidei) (Nelson, 2006). El monofiletisme d'aquest subordre basat en 3 caràcters morfològics (Dyer i Chernoff, 1996) també ha estat confirmat per les nostres dades moleculars. Les distàncies genètiques mostrades per la COI (Article IV) entre les tres famílies, Atherinopsidae, Atherinidae i Melanotaeniidae, analitzades dins de l'ordre Atheriniformes (0.2085-0.2237) s'han ajustat a la distància mitjana entre famílies del mateix ordre de peixos (0.2256; Ward, 2009). En aquestes comparacions, la distància detectada entre la família Atherinidae i Melanotaeniidae ha resultat ser la més baixa, tal i com s'esperaria trobar per la seva pertinença al mateix subordre Atherinoidei, diferenciant-se del subordre Atherinopsidae a on s'hi ubicaria la família Atherinopsidae que inclouria a *Odontesthes*. Així mateix, aquesta diferenciació també es veu reforçada per l'anàlisi filogenètica a on s'observen clarament els agrupaments en funció dels dos subordres adscrits, corroborant així l'adequació de la classificació vigent (Nelson, 2006) amb la recent creació de la família Atherinopsidae i el subordre Atherinopsidae desvinculant-lo de la família Atherinidae i subordre d'Atherinoidei, a dins d'on hi estava inclosa la família Atherinopsidae anteriorment (Nelson, 1994).

Ambdós subordres, Atherinopsoidei i Atherinoidei, formen part de l'ordre Atheriniformes i, juntament amb l'ordre Cyprinodontiformes i Beloniformes, constitueixen els tres ordres de la sèrie Atherinomorpha (Nelson, 2006). Les interrelacions dins i entre els ordres i subordres d'Atherinomorpha encara romanen bastant incertes (Setiamarga et al., 2008) ja que encara calen moltes més dades moleculars per testar la seva classificació actual. L'ordre Atheriniformes fou creat per Rosen (1964) fonamentant-se en la seva osteologia i biologia reproductiva. El seu monofiletisme va ser corroborat primerament per White et al. (1984), basant-se en caràcters larvals, i posteriorment per altres autors en base a la seva morfologia (Stiassny, 1993; Saeed et al., 1994; Dyer i Chernoff, 1996; Parenti, 2005). No obstant, també existeixen altres estudis morfològics que el rebutgen (Rosen i Parenti, 1981; Parenti, 1984). Els altres dos ordres, Cyprinodontiformes i Beloniformes, també es van diagnosticar com a monofilètics per diversos estudis morfològics (Rosen i Parenti, 1981; Stiassny, 1993; Saeed et al., 1994; Dyer i Chernoff, 1996; Wiley et al., 2000; Li, 2001; Parenti, 2005). Tots aquests estudis havien revelat que aquests dos ordres eren taxons germans entre ells i, per aquesta raó, Dyer i Chernoff (1996) va proposar el superordre Cyprinodonta per englobar-los, com així surt recollit en la classificació de Nelson (2006). A més, també es va constatar com, a la vegada, l'ordre Atheriniformes era el taxó germà del grup Cyprinodonta (Dyer i Chernoff, 1996). Per aquest motiu, Nelson (2006) va passar a englobar els Atheriniformes dins del nou superordre Atherinea per reajustar la seva taxonomia. Malgrat tot, com ja s'ha comentat abans, calen les dades de les filogènies moleculars per testar les hipòtesis morfològiques anteriors (Hendry et al., 2000a). Durant els últims 20 anys ha anat augmentant l'aportació tant de dades sobre el seu poc habitual sistema reproductiu com de dades moleculars per inferir les seves relacions filogenètiques (Parenti, 2005). Recentment, Setiamarga et al., (2008) va realitzar la primera filogenia molecular a on es confirmà el monofiletisme dels ordres Atheriniformes, Cyprinodontiformes i Beloniformes i, a més, també va constatar una congruència de la relació entre els superordres Cyprinodonta-Atherinea. És a dir, Cyprinodontiformes i Beloniformes presentaven una relació de taxons germans entre ells, formant el grup Cyprinodonta i, aquest, alhora, ho era d'Atheriniformes, l'únic integrant d'Atherinea. En el nostre cas (Article IV; Figura 2) també hem pogut confirmar el monofiletisme de Cyprinodontiformes i Beloniformes,

però no la seva relació de taxons germans (grup Cyprinodontea) ni tampoc el monofiletisme d'Atheriniformes (Atherinea); tanmateix, l'agrupament diferencial en 2 superordres monofilètics per part dels taxons anteriors no es pot descartar significativament, tal i com ens ha mostrat el resultat del SH-test (Shimodaira i Hasegawa, 1999).

Per altra banda, el que resulta més interessant dels resultats és que la distància genètica detectada en la COI entre els dos subordres d'Atheriniformes, Atherinopsoidei i Atherinoidei, (0.2150 ± 0.0165) s'ajusta al rang de distàncies entre diferents ordres de peixos ($0.1427-0.3988$) (Ward, 2009). A més, quan es realitza l'estudi que inclou a tots els subordres d'Atherinomorpha (Article IV; Taula1), en el qual s'analitza Phe+12SrRNA+COI, s'obté un resultat similar. Es comprova que el rang de distàncies mostrat entre els dos subordres dels que consta cadascun dels tres ordres de la sèrie Atherinomorpha ($0.1569-0.2036$) es troba dins de les distàncies detectades entre diferents ordres d'altres sèries de peixos com Mugilomorpha i Percomorpha ($0.1248-0.2700$). Per tant, les distàncies genètiques han revelat que els diferents subordres investigats dins d'Atherinomorpha podrien estar en el nivell dels valors interordinals, per la qual cosa se suggereix l'elevació a una categoria superior dels mateixos. Les hipòtesis filogenètiques dels subgrups que conformen Atherinomorpha podrien jugar un paper molt important en la comprensió del sistema reproductor dels peixos (Parenti, 2005), així com provocar un reajustament en la seva classificació. Malauradament, caldrien anàlisis més extenses per poder incloure d'aquesta manera a les 21 famílies amb les 1.552 espècies de les que consta la sèrie Atherinomorpha.

4.2. FILOGÈNIA ATHERINOMORPHA-MUGILOMORPHA

Diferents estudis han intentat esbrinar la posició filogenètica d'Atherinomorpha dins dels peixos teleostis, fet que implícitament també guarda relació amb la confirmació del seu monofiletisme i el de les dues sèries amb les quals es troba relacionada, Mugilomorpha i Percomorpha, dins dels peixos Acanthopterygii. Amb dades morfològiques, el monofiletisme d'Atherinomorpha va ser demostrat per diferents autors (Rosen, 1964; Rosen i Parenti, 1981; Parenti, 1993; Stiassny, 1993; Dyer i Chernoff, 1996; Parenti i Grier, 2004; Parenti, 2005). Pel que sembla, sobretot els caràcters morfològics derivats del tipus peculiar de testicles i les modificacions associades a la reproducció són les principals evidències de la seva monofília (Parenti, 2005). Per altra banda, la filogènia amb dades morfològiques d'Atherinomorpha respecte a les altres dues sèries d'Acanthopterygii ha donat resultats molt diversos al llarg d'aquests anys. Així trobaríem diferents hipòtesis com, per exemple, Atherinomorpha com al taxó germà de Percomorpha en termes generals, sense l'especificació de cap grup de pèrcids en concret (Rosen i Parenti, 1981), o alhora de Percomorpha i Paracanthopterygiis (Parenti, 1993), o de Mugilomorpha (Stiassny, 1993). Per altra banda, Johnson i Patterson (1993), tot i estar d'acord amb el monofiletisme d'Atherinomorpha, aquest quedaria inclòs dins d'un nou taxó juntament amb Synbranchoides, Mastacembeloides, *Elassoma*, Gasterosteiformes i Mugilomorpha, que va anomenar Smegmamorpha, format en base a un únic tret morfològic, i que quedaria englobat dins de la sèrie Percomorpha. Posteriorment, treballs moleculars han recolzat el monofiletisme d'Atherinomorpha (Miya et al., 2003; Mabuchi et al., 2007; Kawahara et al., 2008; Setiamarga et al., 2008) a l'igual que els resultats presentats en aquesta tesi. En canvi, d'altres el van rebutjar perquè s'hi inclourien o mugílids i/o pèrcids a dins de la mateixa agrupació (Wiley et al., 2000; Chen et al., 2003; Dettai i Lecointre, 2005; Miya et al., 2005), probablement, segons Setiamarga et al. (2008), pel fet d'haver utilitzat menys de cinc espècies diferents d'Atherinomorpha.

De totes les filogènies moleculars anteriors, només la nostra presenta la sèrie Atherinomorpha com el taxó germà de la sèrie Mugilomorpha i ambdues sèries agrupant-se alhora de forma robusta en un mateix *cluster* monofilètic. El present treball

seria també la primera confirmació genètica del monofiletisme dels mugílids amb un nombre elevat d'espècies diferents analitzades. A l'igual que l'argumentació anterior de Setiamarga et al. (2008), podria ser que la causa per la qual les anàlisis moleculars anteriors no haurien trobat aquest agrupament Atherinomorpha-Mugilomorpha (A-M) fos per haver utilitzat, com a molt, dues espècies diferents de mugílids. Aquesta proximitat entre A-M s'ha vist també recolzada, a part de per la filogènia morfològica realitzada per Stiassny (1993), per una musculatura de l'abductor mandibular idèntica en la sèrie Atherinomorpha i Mugilomorpha i totalment diferent en la sèrie Percomorpha (Wu i Shen, 2004). Per altra banda, amb les nostres anàlisis, també es descartaria el monofiletisme d'un possible grup Smegmamorpha proposat per Johnson i Paterson (1993). No obstant, el nostre agrupament A-M no s'ha pogut desvincular completament de la sèrie Percomorpha, ni determinar-la com el seu taxó germà, tal i com va proposar Stiassny (1993), perquè el grup A-M hi quedaria inclòs a dins d'ella. En comptes d'això, A-M es mostraria com el taxó germà de tota la resta de membres de Smegmamorpha [que són (seguint la nomenclatura i numeració de la Figura 2 de l'Article IV): els Synbranchoides (Synbranchiformes 1), els Mastacembeloides (Synbranchiformes 2), *Elassoma* (Perciformes 2, 3) i Gasterosteïformes (Gasterosteïformes 1, 2)], al qual se li hauria d'unir el subordre Percoidei (Perciformes 1), l'únic que no pertanyeria al "club" SMEGMA. Així mateix, tots ells apareixerien junts en un mateix *cluster* amb un 100% de valor de bootstrap, mostrant així la proximitat genètica entre ells. Tanmateix, calen molts més estudis filogenètics per testar la possible monofilia dels Smegmamorpha, així com per avaluar la relació del grup A-M amb la sèrie Percomorpha. Malauradament, cal tenir en compte que la sèrie Percomorpha és la més nombrosa dels peixos Acanthopterygii ja que consta de 245 famílies amb 13.173 espècies (Nelson, 2006). Per tant, la feina que representarà tota aquesta anàlisi serà bastant feixuga, però necessària.

La incorporació de la tècnica de seqüenciació del DNA ha permès que la disciplina de la sistemàtica molecular es convertís en una potent eina per resoldre conflictes d'alguns grups d'organismes, tant en el marc de la filogènia com de la classificació (Freeman i Herron, 2004), com així hem pogut comprovar al llarg d'aquesta tesi doctoral. A més, a través de la genètica molecular també es poden observar els patrons de biodiversitat que ens permeten elucidar els processos que creen aquesta diversitat i la mantenen (Carvalho i Hauser, 1999). Llavors, l'estudi de la diversitat de la vida, tant intraespecífica com interespecífica, no hauria d'estar únicament lligat i restringit arbitràriament a la seva morfologia (Kullander, 1999), per la qual cosa, caldria una aproximació multidisciplinària i integrativa en la disciplina taxonòmica (Dayrat, 2005). Una de les propostes més recents és que dels espècimens tipus, o dels que s'hagin de dipositar a les col·leccions dels museus, s'obtingui teixit per tal de poder-li extreure DNA per seqüenciar i, a través de la web, elaborar una plataforma universal de base de dades accessible per dipositar aquesta informació taxonòmica (Tautz et al., 2003). Aquesta biblioteca taxonòmica, que alguns autors indiquen que hauria de ser de mtDNA (Hebert et al., 2003; Ellis et al., 2006), donaria un nou impuls a la recerca en la biodiversitat i esdevindria una eina molecular rutinària per identificar espècimens en qualsevol estadi de la seva vida (Hajibabei et al., 2007). La utilitat de les seqüències de DNA amb un propòsit taxonòmic es veu clarament establert amb el muntatge del *Tree of Life* (www.tolweb.org/tree/), que és el major repte dels sistemàtics dels últims 20 anys i el marc fonamental per ordenar-hi la informació biològica (Soltis i Soltis, 2001). Aquest fet s'ha vist reflectit en un augment en el nombre de projectes a gran escala que han anat incorporant dades de seqüències de DNA per resoldre la filogènia de les diferents branques d'aquest arbre de la vida (Hajibabei et al., 2007). Una vegada que la major part d'aquesta informació s'hagi analitzat i, donat que els taxa emprats a la mateixa categoria taxonòmica no són necessàriament equivalents en la seva edat evolutiva, diferents autors (Avise i Johns, 1999; Avise i Walker 2000) proposen realitzar filogènies datades. És a dir, la separació filogenètica dels nodes de totes les formes de vida s'hauria d'indicar amb els temps evolutius de les eres geològiques, fet que ajudaria a estandarditzar les classificacions conegudes fins a l'actualitat.

Com s'ha pogut comprovar, les revisions taxonòmiques, per tant, permeten ajustar les classificacions amb la història evolutiva (Ghiselin, 2002), però, malauradament, moltes vegades el nombre d'individus que es poden estudiar a la pràctica són restringits. A més, malgrat que existeixin 27.977 espècies descrites de peixos al món (Nelson, 2006), la majoria de biòlegs treballen amb mamífers i ocells (Turner, 1999). Per exemple, en la base de dades *GenBank*, fins a principis de l'any 2010, es pot observar la descompensació en la proporció d'espècies de mamífers (5.416; Wilson i Reeder, 2005) amb la seva aportació tant de seqüències com de genomes, >44 milions i 642 respectivament, en relació a les espècies d'*Acanthopterygii* (14.791; Nelson, 2006) i les seves aportacions, >1 milió i 314 respectivament. Per tant, de les dades anteriors, es pot extreure que encara hi ha molta feina per realitzar en el món de la genètica de peixos. Així, finalment, donat que les classificacions estan subjectes a contínua revisió, ja que, en definitiva, no són més que temptatives teòriques per organitzar i emmagatzemar la informació (Futuyma, 2005), la ictiologia sistemàtica ens resulta clarament un camp per anar-hi investigant i progressant activament i la present aportació, en forma de tesi doctoral, espero que serveixi d'utilitat i motivació de recerques futures amb aquest propòsit.

5. CONCLUSIONS

S'ha realitzat l'anàlisi genètica mitjançant seqüenciació directa de set marcadors del DNA mitocondrial de taxons pertanyents a les sèries Mugilomorpha i Atherinomorpha dins dels peixos Acanthopterygii. Dels resultats obtinguts es poden extreure les següents conclusions:

1. Les dades moleculars confirmen que els espècimens identificats morfològicament com *M. curema* a Laguna de Mar Chiquita (Argentina) formen part del llinatge corresponent a *M. curema* demostrant la utilitat dels marcadors genètics. Aquesta troballa en seria la primera descripció a aquesta regió geogràfica tan meridional ampliant, així, la seva distribució mundial.
2. S'han detectat tres tipus genèticament diferenciables de *M. curema* que es correspondrien a tres espècies que es trobaven sota la mateixa nomenclatura, indicant la

necessitat de la revisió del taxó per així reflectir la filogènia amb dades genètiques en la seva classificació.

3. Les distàncies genètiques obtingudes amb la metodologia molecular entre *M. platanus* (Argentina) i *M. cephalus* (Mediterrani) es troben al mateix nivell que els valors de les comparacions intragenèriques, és a dir, comparacions entre diferents espècies del mateix gènere, reconeixent així a *M. platanus* com a una espècie al·lopàtricament vàlida diferenciant-la de *M. cephalus*.

4. *M. platanus* Günther, 1880 i *M. liza* Valenciennes, 1836 serien dos morfotips atribuïbles a una mateixa espècie, (*M. liza* Valenciennes, 1836 sota el principi de prioritat) per l'escassa divergència genètica detectada i pels haplotips compartits entre ells, indicatiu d'un elevat flux genètic que impedeix una diferenciació entre aquests dos taxons com a dues espècies diferents. Tanmateix, es podrien estar produint uns estadis incipients d'especiació ecològica per part d'aquests taxons, fet que s'hauria de confirmar amb un marcador molecular més variable com la regió control.

5. *M. cephalus* ha presentat una marcada diferenciació molecular entre les diferents poblacions mundials geogràficament aïllades que fa trontollar l'assignació a una espècie única i cosmopolita de les mostres analitzades. El fet que els cinc diferents haplogrups detectats, corresponents cadascun a una regió geogràfica diferent, no estiguin compartits entre ells i que aquests llinatges es trobin en al·lopatria indiquen l'existència d'un complex d'espècies diferents al llarg del rang de distribució de *M. cephalus*. L'haplogrup constituït per *M. platanus* i *M. liza* és comparable a la resta de llinatges corresponents al complex d'espècies de *M. cephalus*, per la qual cosa, aquest haplogrup també en formaria part.

6. Les diferents anàlisis realitzades a la família Mugilidae ens han constatat el monofiletisme de la mateixa i del gènere *Mugil*. No obstant, els estatus taxonòmics dels

gèneres *Liza* Jordan i Swain, 1884, *Chelon* Artedi, 1793 i *Oedalechilus* Fowler, 1903 no se sostenen des de les dades moleculars obtingudes. Per tant, s'hauria d'eliminar l'assignació d'un gènere propi a cadascun dels taxa anteriors i redescriure un nou gènere (*Chelon* Artedi, 1793 sota el principi de prioritat) incorporant als taxons analitzats a l'espera de futurs estudis que afectin a la resta de membres pendents de ser-ho.

7. Les diferències detectades entre les espècies pertanyents al gènere *Odontesthes* són relativament baixes, la qual cosa podria estar indicant una especiació recent. Així mateix, l'elevada proximitat genètica entre *O. argentinensis* (marí) – *O. bonariensis* (d'aigua dolça) i *O. smitti* (marí) – *O. hatcheri* (d'aigua dolça) ens suggereix un patró d'especiació en forma de parells d'espècies, una de marina amb una altra d'aigua dolça.

8. Dins del gènere *Atherina* s'han pogut detectar diferències genètiques suficients per confirmar un complex d'espècies corresponents a *A. boyeri* (forma marina), *A. punctata* (forma marina amb taques) i *A. lagunae* (forma llacunal), que fins ara estaven assignades a una mateixa entitat taxonòmica, diferenciant-les clarament d'*A. hepsetus*.

9. Dins de l'ordre Atheriniformes, s'ha reconegut el monofiletisme del gènere *Odontesthes*, diferenciant-lo marcadament del gènere *Atherina* i *Melanotaenia*, i dels seus dos subordres respectius, Atherinopsoidei i Atherinoidei verificant la seva separació en dos taxons genèticament diferenciats.

10. Les anàlisis filogenètiques han evidenciat el monofiletisme de la sèrie Atherinomorpha a l'igual que el de la sèrie Mugilomorpha. Alhora també s'ha confirmat la seva proximitat ja que apareixen com a taxons germans, constituint un complex monofilètic. Tanmateix, Atherinomorpha i Mugilomorpha no s'han pogut desvincular completament de la sèrie Percomorpha per la inclusió d'ambdues dins d'aquesta darrera.

6. REFERÈNCIES

Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E., 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Ital. J. Zol.* 71, 5-16.

Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *Q. Rev. Biol.* 79, 161-179.

Alvarado Bremer, J.R., Mejuto, J., Baker, A.J., 1995. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius* L.) populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1720-1732.

Alvarado Bremer, J.R., Stequert, B., Robertson, N.W., Ely, B., 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar. Biol.* 132, 547-557.

Applied Biosystems, 2009.
www.marketing.appliedbiosystems.com/images/Product/Genetic_Analysis/pdf/ABI624_7_SOLiD_Timeline_v4_ONLINE.pdf.

Astolfi, L., Dupanloup, I., Rossi, R., Bisol, P., Faure, E., Congiu, L., 2005. Mitochondrial variability of sand smelt (*Atherina boyeri*, Risso, 1810) populations from North Mediterranean coastal lagoons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 233-243.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79, 137-158.

Avise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 511 pp.

Avise, J.C., 2006. *Evolutionary Pathways in Nature: A Phylogenetic Approach*. Cambridge University Press, New York, 286 pp.

Avise, J.C., Johns, G.C., 1999. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7358-7363.

Avise, J.C., Walker, D., Johns, G.C., 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 265, 1707-1712.

Avise, J.C., Walker, D., 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 992-995.

Avise, J.C., Walker, D., 2000. Abandon all species concepts? A response. *Cons. Genet.* 1, 77-80

Baker, C.S., Dalebout, M.L., Lavery, S., Ross, H.A., 2003. *www.DNA-surveillance: applied molecular taxonomy for species conservation and discovery*. *Trends Ecol. Evol.* 18, 271-272.

Bamber, R.N., Henderson, P.A., 1988. Pre-adaptive plasticity in atherinids and the estuarine seat of teleost evolution. *J. Fish Biol.* 33, 17-23.

Barlow, G.W., 2002. How behavioural studies contribute to the species problem: a piscine perspective. *Fish and Fisheries* 3, 197-212.

Bauchot, M.L., 1987. Poissons osseux. In: Fischer, W., Bauchot, M.L., Schneider, M. (Eds.), *Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. 2. Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1)*. Commission des Communautés Européennes and FAO, Rome, pp. 891-1422.

- Baum, D., Shaw, K.L., 1995. Genealogical perspectives on the species problem. In: Hoch, P.C., Stephenson, A.C. (Eds.), *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp. 289-303.
- Beheregaray, L.B., Caccone, A., 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. *J. Biol.* 6, 9.
- Beheregaray, L.B., Levy, J.A., 2000. Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): Evidence for speciation in an estuary of Southern Brazil. *Copeia* 2, 441-447.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., 2000. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Mol. Ecol.* 9, 629-644.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., 2001. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Mol. Ecol.* 10, 2849-2866.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., Briscoe, D.A., 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 269, 65-73.
- Bemvenuti, M.A., 2006. Silversides in South Brazil: Morphological and ecological aspects. *Biocell* 30, 111-118.
- Bernardi, G., Goswami, U., 1997. Molecular evidence for cryptic species among the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and *Trematomus hansonii*. *Antarct. Sci.* 9, 381-385.
- Bilton, D.T., Paula, J., Bishop, J.D.D., 2002. Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55, 937-952
- Boughman, J.W., 2001. Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature* 411, 944-948.
- Boughman, J.W., 2002. How sensory drive can promote speciation. *Trends Ecol. Evol.* 17, 571-577.
- Bradley, R.D., Baker, R.J., 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *J. Mamm.* 82, 960-973.
- Briggs, J.C., 1960. Fishes of worldwide (circumtropical) distribution. *Copeia* 1960, 171-180.

Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colombo, L., Patarnello, T., 1996. Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 416-424.

Carnevia, D., 2008. Estrategia general para el desarrollo de la acuicultura sostenible en la República Oriental del Uruguay. In: Uruguay. Plan nacional de desarrollo de la acuicultura, DINARA – FAO, Montevideo, 40 pp.

Carvalho, G.R., Hauser, L., 1999. Molecular markers and the species concept: New techniques to resolve old disputes? *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 379-382.

Chen, W.J., Bonillo, C., Lecointre, G., 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 262-288.

Chernoff, B., 2002. Order Atheriniformes. In: Carpenter, K.E. (Ed.), The living marine resources of the western Central Atlantic. Vol. 2. Bony Fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication. FAO, Rome, pp. 601-1374.

Cognetti, G., Maltagliati, F., 2000. Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Mar. Poll. Bull.* 40, 7-14.

Colborn, J., Crabtree, R.E., Shaklee, J.B., Pfeiler, E., Bowen, B.W., 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution* 55, 807-820.

Corti, M., Crosetti, D., 1996. Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using partial warp scores. *J. Fish Biol.* 48, 255-269.

Cousseau, M.B., Perrotta, R.G., 2003. Peces marinos de Argentina: biología, distribución, pesca. INIDEP, Mar del Plata, 1cdrom, 167 pp.

Cousseau, M.B., González Castro, M., Figueroa, D.E., Gosztonyi, A.E., 2005. Does *Mugil liza* Valenciennes 1836 (Teleostei: Mugiliformes) occur in Argentinean waters? *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 40, 133-140.

Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 27.

Cozzolino, M., 2006. National Aquaculture Sector Overview. Italy. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_italy/.

Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1, 159-187.

Cracraft, J., 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D., Endler, J.A. (Eds.), *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 28-59.

Crosetti, D., Avise, J.C., Placidi, F., Rossi, A.R., Sola, L., 1993. Geographic variability in the grey mullet *Mugil cephalus*: preliminary results of mtDNA and chromosome analyses. *Aquaculture* 111, 95-101.

Crosetti, D., Nelson, W.S., Avise, J.C., 1994. Pronounced genetic structure of mitochondrial DNA among populations of the circumglobally distributed grey mullet (*Mugil cephalus*). *J. Fish Biol.* 44, 47-58.

Daniell, E., 1999. Polymerase chain reaction: development of a novel technology in a corporate environment. In: Springham, D.G., Moses, V., Cape, R.E. (Eds.), *Biotechnology-The Science and the Business*. 2nd edition. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 147-154.

Darwin, C.R., 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray Publishers, London, 502 pp.

Darwin, C.R., Wallace, A.R., 1858. On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. *J. Proc. Linn. Soc. Lond. Zool.* 3, 46-50.

Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85, 407-415.

Dettai, A., Lecointre, G., 2005. Further support for the clades obtained by multiple molecular phylogenies in the acanthomorph bush. *C. R. Biol.* 328, 674-689.

Ditty, J.G., Shaw, R.F., 1996. Spatial and temporal distribution of larval striped mullet (*Mugil cephalus*) and white mullet (*M. curema*, Family: Mugilidae) in the

northern Gulf of Mexico, with notes on mountain mullet, *Agonostomus monticola*. Bull. Mar. Sci. 59, 271-288.

Dobzhansky, T., 1935. A critique of the species concept in biology. Philos. Sci. 2, 344-355.

Dobzhansky, T., 1937. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Dyer, B.S., 1997. Phylogenetic revision of Atherinopsinae (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae), with comments on the systematics of the South American freshwater fish genus *Basilichthys* Girard. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich. 185, 1-64.

Dyer, B.S., 1998. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical silverside family Atherinopsidae (Teleostei, Atheriniformes). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 519-536.

Dyer, B.S., 2003. Atherinopsidae (Neotropical silversides). In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. (Eds.), Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 515-525.

Dyer, B.S., 2006. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). Biocell. 30, 69-88.

Dyer, B.S., Chernoff, B., 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). Zool. J. Linn. Soc. 117, 1-69.

Ellis, J.S., Knight, M.E., Carvell, C., Goulson, D., 2006. Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. Mol. Ecol. Notes 6, 540-542.

Eschmeyer, W.N., Fricke, R., 2009. Catalog of Fishes electronic version. <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

FAO, 2005. Marine Resources Service, Fishery Resources Division. Review of the state of world marine fishery resources. FAO Fisheries Technical Paper 457. FAO, Rome, 235 pp.

FAO, 2007. Fishery Statistics. www.fao.org/fishery/statistics/global-production/.

- FAO, 2009. Species Identification Sheet: *Mugil cephalus*. www.fao.org/fishery/species/3050/.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1984. Distance methods for inferring phylogenies: a justification. *Evolution* 38, 16-24.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fisher, R.A., 1921. On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philos. Trans. R. Soc. A-Math. Phys. Eng. Sci.* 122, 309-368.
- Fitch, W.M., 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Sist. Zool.* 20, 406-416.
- Focant, B., Rosecchi, E., Crivelli, A.J., 1999. Attempt at biochemical characterization of sand smelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Pisces, Atherinidae) populations from the Camargue (Rhône delta, France). *Comp. Biochem. Physiol. B* 122, 261-267.
- Fontdevila, A., Moya, A., 2003. La especiación: modelos y casos de estudio. In: *Evolución: origen, adaptación y divergencia de las especies*. Síntesis, Madrid, pp. 165-224.
- Fraga, E., Schneider, H., Nirchio, M., Santa-Brigida, E., Rodrigues-Filho, L.F., Sampaio, I. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 598-604.
- Francisco, S.M., Congiu, L., Stefanni, S., Castilho, R., Brito, A., Ivanova, P.P., Levy, A., Cabral, H., Kiliyas, G., Doadrio, I., Almada, V.C., 2008. Phylogenetic relationships of the North-eastern Atlantic and Mediterranean forms of *Atherina* (Pisces, Atherinidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 782-788.
- Freeman, S., Herron, J.C., 2004. *Evolutionary Analysis*. 3rd edition. Pearson Education, New Jersey, 816 pp.
- Froese, R., 1999. The good, the bad, and the ugly: A critical look at species and their institutions from a user's perspective. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 375-378.
- Froese, R., Pauly, D., 2009. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org.

Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 34, 397-423.

Futuyma, D.J., 1998. *Evolutionary biology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, 763 pp.

Futuyma, D.J., 2005. *Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, 603 pp.

Gallardo-Cabello, M., Ibáñez Aguirre, A.L., 2004. Reproduction of *Mugil cephalus* and *M. curema* (Pisces: Mugilidae) from a coastal lagoon in the Gulf of Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 75, 37,49.

Ghiselin, M.T., 2002. Species concepts: the basis for controversy and reconciliation. *Fish and Fisheries* 3, 151-160.

Gilbert, C.R., 1993. Geographic distribution of the striped mullet (*Mugil cephalus*) in the Atlantic and Eastern Pacific oceans. *Florida Sci.* 56, 204-210.

Gill, A.C., Kemp, J.M., 2002. Widespread Indo-Pacific shore-fish species: a challenge for taxonomists, biogeographers, ecologists, and fishery and conservation managers. *Environ. Biol. Fish.* 65, 165-174.

Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G.R., Lunt, D.H., 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* 56, 1431-1444.

González Castro, M., Díaz de Astarloa, J.M., Cousseau, M.B., 2006. First record of a tropical affinity mullet, *Mugil curema* (Mugilidae), in a temperate southwestern Atlantic coastal lagoon. *Cybium* 30, 90-91.

González Castro, M., Abachian, V., Perrotta, R.G., 2009. Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S–57°19'W): a proposal for a life-history model. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 61-66.

Grant, V., 1971. *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York, 435 pp.

Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23, 167-172.

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

Harrison, I.J., 1993. Comment on the proposed conservation of the specific names of *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes). Bull. Zool. Nomencl. 50, 144-147.

Harrison, I.J., 2002. Mugilidae: mullets. In: Carpenter, K. (Ed.), The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic. Vol. 2. Bony Fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome, pp. 1071-1085.

Harrison, I.J., Nirchio, M., Oliveira, C., Ron, E., Gaviria, J., 2007. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. J. Fish Biol. 71, 76-97

Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 22, 160-174.

Heads, M., 2005. Towards a panbiogeography of the seas. Biol. J. Linn. Soc. 84, 675-723.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 270, 313-321.

Hendry, A.P., Vamosi, S.M., Latham, S.J., Heilbuth, J.C., Day, T., 2000a. Questioning species realities. Cons. Genet. 1, 67-76.

Hendry, A.P., Wenburg, J.K., Bentzen, P., Volk, E.C., Quinn, T.P., 2000b. Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: evidence from introduced salmon. Science 290, 516-518.

Hennig, W., 1950. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag, Berlin, 370 pp.

Hewitt, G.M., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. Mol. Ecol. 10, 537-549.

Hey, J., 2001. Genes, categories, and species: the evolutionary and cognitive causes of the species problem. Oxford University Press, Oxford, pp. 217.

Hill, K., 2004. Smithsonian Marine Station at Fort Pierce (On-line). http://www.sms.si.edu/irlspec/Mugil_cephal.htm.

Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., Zimmer, E.A., 1996a. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), Molecular systematics. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 321-381.

Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C., 1996b, Applications of Molecular Systematics: The State of the Field and a Look to the Future. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), Molecular systematics. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 515-543.

Hotos, G.N., Vlahos, N., 1998. Salinity tolerance of *Mugil cephalus* and *Chelon labrosus* (Pisces: Mugilidae) fry in experimental conditions. Aquaculture 167, 329-338.

Huxley, J., 1940. The New Systematics. Clarendon Press., Oxford, 583 pp.

ICZN, 1994. **Opinion 1787** *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes): species names conserved. Bull. Zool. Nomencl. 51, 286-287.

Ibáñez-Aguirre, A.L., Leonart, J., 1996. Relative growth and comparative morphometrics of *Mugil cephalus* L. and *M. curema* V. In the Gulf of Mexico. Sci. Mar. 60, 361-368.

Iribarne, O., 2001. Reserva de Biosfera Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas. UNESCO-Editorial Martín, Mar del Plata, 320 pp.

Jablonski, D., Finarelli, J.A., 2009. Congruence of morphologically-defined genera with molecular phylogenies Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.106, 8262-8266.

Jardim Albieri, R., 2009. Biologia reprodutiva da tainha *Mugil liza* Valenciennes e do Parati *Mugil curema* Valenciennes (Actinopterygii, Mugilidae) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. Thesis, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, Brazil.

Johns, G.C., Avise, J.C., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. Mol. Biol. Evol. 15, 1481-1490.

Johnson, G.D., Patterson, C., 1993. Percomorph phylogeny: a survey of Acanthomorphs and a new proposal. Bull. Mar. Sci. 52, 554-626.

Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp. 21-132.

Kawahara, R., Miya, M., Mabuchi, K., Lavoué, S., Inoue, J.G., Satoh, T.P., Kawaguchi, A., Nishida, M., 2008. Interrelationships of the 11 gasterosteiform families (sticklebacks, pipefishes, and their relatives): a new perspective based on the whole mitogenome sequences from 75 higher teleosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 224-236.

Kazancioglu, E., Near, T.J., Hanel, R., Wainwright, P.C., 2009. Influence of sexual selection and feeding functional morphology on diversification rate of parrotfishes (Scaridae). *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 276, 3439-3446.

Khorana, H.G., Büchi, H., Gosh, H., Gupta, N., Jacob, T.M., Kössel, H., Morgan, R., Naranga, S.A., Ohtsuka, E., Wells, R.D., 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 31, 39-49.

Kimura, M., 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.

Kimura, M., 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 454-458.

Klossa-Kilia, E., Prassa, M., Papatiroopoulos, V., Alahiotis, S., Kiliias, G., 2002. Mitochondrial DNA diversity in *Atherina boyeri* populations as determined by RFLP analysis of three mtDNA segments. *Heredity* 89, 363-370.

Klossa-Kilia, E., Papatiroopoulos, V., Tryfonopoulos, G., Alahiotis, S., Kiliias, G., 2007. Phylogenetic relationships of *Atherina hepsetus* and *Atherina boyeri* (Pisces: Atherinidae) populations from Greece, based on mtDNA sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* 92, 151-161.

Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 189-216.

Knowlton, N., 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiol.* 420, 73-90.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6196-6200.

Kon, T., Yoshino, T., Mukai, T., Nishida, M., 2007. DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: A lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 53-62.

Kullander, S.O., 1999. Fish species – how and why. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 325-352.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* 5, 150-163.

Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20, 86-93.

Lefébure, T., Doudady, C.J., Malard, F., Gibert, J., 2007. Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 676-686.

LeGrande, W.H., Fitzsimons, J.M., 1976. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *M. cephalus* (Perciformes: Mugilidae) from Louisiana. *Copeia* 2, 388-391.

Lestrel E.P., 2000. Morphometrics for the life sciences. In: Oxnard, C.E. (Ed.), *Recent Advances in Human Biology*. Vol. 7. World Scientific Publishing, London, pp. 191-227

Lleonart, J., Salat, J., Torres, G.J., 2000. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *J. Theor. Biol.* 205, 85-93.

Lombarte, A., Lleonart, J., 1993. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fishes* 37, 297-306.

Li, S.Z., 2001. On the position of the suborder Adrianichthyoidei. *Acta Zootax. Sin.* 26, 583-588.

Lovejoy, N.R., Albert, J.S., Crampton, W.G.R., 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *J. South Am. Earth Sci.* 21, 5-13.

Mabuchi, K., Miya, M., Azuma Y., Nishida, M., 2007. Independent evolution of the specialized pharyngeal jaw apparatus in cichlid and labrid fishes. *BMC Evol. Biol.* 7, 10.

Maddison, W.P., 1996. Molecular Approaches and the Growth of Phylogenetic Biology. In: Ferraris, J.D., Palumbi, S.R. (Eds.), Molecular Zoology: advances, strategies and protocols. John Wiley and Sons, New York, pp. 47-63.

Maddison, D.R., Maddison, W.P., 1996. The Tree of Life Project. Previously available from www.phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html.

Maugé, L.A., 1990. Atherinidae. In: Quéro, J.C., Hureau J.C., Karrer, C., Post, A., Saldanha, L. (Eds.), Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Vol. 2. UNESCO, Paris, pp. 604-605.

Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 560-564.

Mayden, R.L., 2002. On the biological species, species concepts and individuation in the natural world. Fish and Fisheries 3, 171-196.

Mayr, E., 1942. Systematics and the Origin of Species. Jody Columbia University Press, New York, 334 pp.

Mayr, E., 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, 797 pp.

Mayr, E., Aschlock, P.D., 1991. Principles of systematic zoology. 2nd edition. Prancan, K., Gordon, H. (Eds.). McGraw-Hill, New York, 473 pp.

McDonough, C.J., Roumillat, W.A., Wenner, C.A., 2003. Fecundity and spawning season of striped mullet (*Mugil cephalus* L.) in South Carolina estuaries. Fish. Bull. 101, 822-834.

Mefford, H.P., 1955. First record of the mullet *Mugil liza* from Florida. Copeia 1955, 149.

Menezes, N.A., 1983. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. Rev. Bras. Zool. 2, 1-12.

Menni, R.C., 2004. Peces y ambientes en la Argentina continental. Monogr. Mus. Argent. Cienc. Nat. 5, 1-314.

Milana, V., Sola, L., Congiu, L., Rossi, A.R., 2008. Mitochondrial DNA in *Atherina* (Teleostei, Atheriniformes): differential distribution of an intergenic spacer in lagoon and marine forms of *Atherina boyeri*. J. Fish Biol. 73, 1216-1227.

Miya, M., Nishida, M., 1997. Speciation in the open ocean. *Nature* 389, 803-804.

Miya, M., Nishida, M., 1999. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Mar. Biotechnol.* 1, 416-426.

Miya, M., Nishida, M., 2000. Use of mitogenomic information in Teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 437-455.

Miya, M., Kawaguchi, A., Nishida, M., 2001. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1993-2009.

Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B., Inoue, J.G., Mukai, T., Satoh, T.P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., Shirai, S.M., Nishida, M., 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 12-138.

Miya, M., Satoh, T.P., Nishida, M., 2005. The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genomes sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* 85, 289-306.

Moritz, C., Hillis, D.M., 1996. Molecular systematics: Context and Controversies. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular systematics*. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 1-13.

Moussi, N., 2006. National Aquaculture Sector Overview. Algeria. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_algeria/.

Murgia, R., Tola, G., Archer, S.N., Vallerga, S., Hirano, J., 2002. Genetic identification of gray mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (bottarga). *Mar. Biotechnol.* 4, 119-126.

Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the world*. 3rd edition. John Wiley and Sons, New York, pp. 260.

Nelson, J.S., 2006. Fishes of the world. 4th edition. John Wiley and Sons, New York, 601 pp.

Nirchio, M., Cequea, H., 1998. Karyology of *Mugil liza* and *M. curema* from Venezuela. Bol. Inv. Mar. Cost. 27, 45-50.

Nirchio, M., González, D., Pérez, J.E., 2001. Estudio Citogenético de *Mugil curema* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae). Regiones organizadoras del nucleolo. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente, 40, 3-7.

Nirchio, M., Cervigón, F., Revelo Porto, J.I., Pérez, J.E., Gómez, J.A., Villalaz, J., 2003. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. Sci. Mar. 67, 113-115.

Nirenberg, M., Caskey, T., Marshall, R., Brimacombe, R., Kellogg, D., Doctor, B., Hatfield, D., Levin, J., Rottman, F., Pestka, S., Wilcox, M., Anderson, F., 1966. The RNA code and protein synthesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 31, 11-24.

Normark, B.B., McCune, A.R., Harrison, R.G., 1991. Phylogenetic relationships of Neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. Biol. Evol. 8, 819-834.

Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest, version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Ospina-Arango, J.F., Pardo-Rodríguez, F.I., Álvarez-León, R., 2008. Madurez gonadal de la ictiofauna presente en la Bahía de Cartagena, Caribe colombiano. Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. 12, 117-140.

Pallaoro, A, Dulcic, J., Jardas, I., Kraljevic, M., 2007. Some biological parameters of the Mediterranean sand smelt *Atherina (Atherina) hepsetus*, Linnaeus, 1758 (Pisces: Atherinidae) from the middle eastern Adriatic (Croatian coast). J. Appl. Ichthyol. 23, 189-192.

Palumbi, S.R., Cipriano, F., 1998. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. J. Hered. 89, 459-464.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.

Papasotiropoulos, V., Klossa-Kilia, E., Kilia, G., Alahiotis, S., 2001. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) using allozyme data. *Biochem. Genet.* 39, 155-168.

Papasotiropoulos, V., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G., Alahiotis, S., 2002. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochem. Genet.* 40, 71-86.

Parenti, L.R., 1984. On the relationships of phallostethid fishes (Atherinomorpha), with notes on the anatomy of *Phallostethus dunckeri* Regan, 1913. *Am. Mus. Novit.* 2779, 1-12.

Parenti, L.R., 1993. Relationships of atherinomorphs fishes (Teleostei). *Bull. Mar. Sci.* 52, 170-196.

Parenti, L.R., 2005. The phylogeny of Atherinomorphs: Evolution of a novel fish reproductive system. In: Uribe, M.C., Grier, H.J. (Eds.), *Viviparous Fishes*. New Life Publications, Florida, pp. 13-30.

Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44, 333-348.

Parisi-Baradad, V., Lombarte, A., Garcia-Ladona, E., Cabestany, J., Piera, J., Chic, O., 2005. Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms and curvature scale space representation.

Paterson, H.E.H., 1985. The recognition concept of species. In: Vrba, E.S. (Ed.), *Species and Speciation*. Pretoria Transvaal Museum, Pretoria, pp. 21-29.

Pereira Esper, M.L., Santos de Menezes, M., Esper, W., 2001. Reproductive epoch of *Mugil platanus* (Günther, 1880), (Pisces, Mugilidae) from the Baía de Paranaguá (Paraná, Brazil). *Acta Biol. Par. Curitiba* 30, 5-17.

de Pinna, M.C.C., 1999. Species concepts and phylogenetics. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 353-373.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

Price, P.W., 1996. *Biological Evolution*. Saunders College Publishing, Philadelphia, 576 pp.

de Queiroz, K., 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6600-6607.

- de Queiroz, K., Donoghue, M.J., 1990. Phylogenetic systematics and species revisited. *Cladistics* 6, 83-90.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355-364.
- Rocha-Olivares, A., Garber, N.M., Stuck, K.C., 2000. High genetic diversity, large inter-oceanic divergence and historical demography of the striped mullet. *J. Fish Biol.* 57, 1134-1149.
- Rohlf, F.J., Archie, J.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Syst. Zool.* 33, 302-317.
- Rohlf, F.J., 1990. Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 299-316.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F., 1993. A revolution in Morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* 8, 129-132.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rosen, D.E., 1964. The relationships and taxonomic position of the halfbeaks, killifishes, silversides and their relatives. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 127, 217-268.
- Rosen, D.E., Parenti, L.R., 1981. Relationships of *Oryzias*, and the groups of atherinomorph fishes. *Amer. Mus. Novit.* 2719, 1-25.
- Rosin, P.L., 1999. Measuring rectangularity. *Mac. Vision Appl.* 11, 191-196.
- Rossi, A.R., Crosetti, D., Gornung, E., Sola, L., 1996. Cytogenetic analysis of global populations of *Mugil cephalus* (striped mullet) by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Heredity* 76, 77-82.
- Rossi, A.R., Capula, M., Crosetti, D., Sola, L., 1998a. Allozyme variation in global populations of striped mullet, *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae). *Mar. Biol.* 131, 203-212.
- Rossi, A.R., Capula, M., Crosetti, D., 1998b. Genetic divergence and phylogenetic inferences in five species of Mugilidae (Pisces: Perciformes). *Mar. Biol.* 131, 213-218.
- Rossi, A.R., Ungaro, A., De Innocentiis, S., Crosetti, D., Sola, L., 2004. Phylogenetic analysis of Mediterranean mugilids by allozymes and 16S mt-rRNA genes

investigation: are the Mediterranean species of *Liza* monophyletic? *Biochem. Genet.* 42, 301-315.

Saeed, B., Ivantsoff, W., Crowley, L.E.L.M., 1994. Systematic relationships of atheriniform families within Division I of the Series Atherinomorpha (Acanthopterygii) with relevant historical perspectives. *Voprosi Ikhtiologii* 34, 1-32.

SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos), 2007. www.produccion-animal.com.ar.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Elrich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-425.

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

Saleh, M.A., 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugil_cephalus/.

Salem, A.M., Saleh, M.A., 2003. National Aquaculture Sector Overview. Egypt. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_egypt/

Sambrook, J., Fritsh, E.J., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 253 pp.

Sampaio, L.A., Ferreira, A.H., Tesser, M.B., 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Scientiarum* 23, 471-475.

Sanders, K.L., Malhotra, A., Thorpe, R.S., 2006. Combining molecular, morphological and ecological data to infer species boundaries in a cryptic tropical pitviper. *Biol. J. Linn. Soc.* 87, 343-364.

Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A., Villavicencio-Garayzar, C., Balart, E., 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 145, 983-988.

- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448.
- Schultz, L.P., 1946. A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae, with descriptions of three new genera. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 96, 377-395.
- Scotland, R.W., Olmstead, R.G., Bennet, J.R., 2003. Phylogeny reconstruction: The role of morphology. *Syst. Biol.* 54, 539-548.
- Seehausen, O., Terai, Y., Magalhaes, I.S., Carleton, K.L., Mrosso, H.D.J., Miyagi, R., van der Sluijs, I., Schneider, M.V., Maan, M.E., Tachida, H., Imai, H., Okada, N., 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 455, 620-626.
- Semina, A.V., Polyakova, N.E., Brykov, V.A., 2007. Analysis of mitochondrial DNA: taxonomic phylogenetic relationships in two fish taxa (Pisces: Mugilidae and Cyprinidae). *Biochemistry (Moscow)* 72, 1349-1355.
- Setiamarga, D.H.E., Miya, M., Yamanoue, Y., Mabuchi, K., Satoh, T.P., Inoue, J.G., Nishida, M., 2008. Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): the first evidence based on whole mitogenomes sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 598-605.
- Shapiro, J., 2006. National Aquaculture Sector Overview. Israel. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_israel/.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1114-1116.
- Simpson, G.G., 1951. The species concept. *Evolution* 5, 285-298.
- Simpson, G.G., 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York, 247 pp.
- Sites, J.W., Jr, Marshall, J.C., 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18, 462-470.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., Hood, L.E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674-679.
- Sokal, R.R., Sneath, P.H., 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 359 pp.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11, 34-40.

Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2001. Molecular systematics: assembling and using the Tree of Life. *Taxon* 50, 663-677.

de Sostoa, A., Allué, R., Bas, C., Camarasa, J.M., Casals, F., Casaponsa, J., del Castillo, M., Doadrio, I., Fernández, J.V., Franquesa, R., Lloris, D., Lobón-Cerviá, J., Matallanas, J., Muñoz, R., de Sostoa, F. J., Vinyoles, D., 1990. Peixos. Vol. 11. In: Folch, R. (Ed.), *Història Natural dels Països Catalans*. Fundació Enciclopèdia Catalana, Barcelona, 487 pp.

Stauffer, J.R., Jr, Kocovsky, P.M., Ruffing, R.A., 2002. Species concepts and speciation of fishes: concluding remarks. *Fish and Fisheries* 3, 230-232.

Stiassny, M.L., 1993. What are grey mullets? *Bull. Mar. Sci.* 52, 197-219.

Strauss, R.E., Bookstein, F.L., 1982. The truss: body form reconstruction in morphometrics. *Syst. Zool.* 31, 113-135.

Strickberger, M.W., 2000. *Evolution*. 3rd edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 222.

Strüssmann, C.A., Akaba, T., Ijima, K., Yamaguchi, K., Yoshizaki, G., Takashima, F., 1997. Spontaneous hybridization in the laboratory and genetic markers for the identification of hybrids between two atherinid species, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) and *Patagonina hatcheri* (Eigenmann, 1909). *Aquac. Res.* 28, 291-300.

Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9, 1699-1710.

Swofford, D.L., 2002. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18, 70-74.

Tavaré, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lec. Math. Life Sci.* 17, 57-86.

Taylor, E.B., 1999. Species pairs of north temperate freshwater fishes: Evolution, taxonomy, and conservation. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 299-324.

Tejedor, D., 2001. El pejerrey como recurso genético. In: Grosman, F. (Ed.), *Fundamentos biológicos económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Astyanax, Buenos Aires, pp. 27-31.

Templeton, A.R., 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: Otte, D.J., Endler, J.A. (Eds.), *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 3-27.

Thollesson, M., 2001. *Bioinformatics–Phylogenetic inference* (web booklet). Evolutionary Biology Centre and Linnaeus Centre for Bioinformatics, Uppsala University, Sweden.

Thomson, J.M., 1997. The Mugilidae of the world. *Mem. Qld. Mus.* 41, 457-562.

Tiedemann, R., Harder, J., Gmeiner, C., Haase, E., 1996. Mitochondrial DNA sequence patterns of Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North and the Baltic Sea. *Z. Säugetierkunde* 61, 104-111.

Trabelsi, M., Faure, E., Quignard, J.P., Boussaïd, M., Focant, B., Mâamouri, F., 2002a. *Atherina punctata* and *Atherina lagunae* (Pisces, Atherinidae), new species in the Mediterranean Sea, 1. Biometric investigations of three atherinid species. *C. R. Biologies* 32, 967-975.

Trabelsi, M., Gilles, A., Fleury, C., Mâamouri, F., Quignard, J.P., Faure, E., 2002b. *Atherina punctata* and *Atherina lagunae* (Pisces, Atherinidae), new species found in the Mediterranean Sea, 2. Molecular investigations of three atherinid species. *C. R. Biologies* 325, 1119-1128.

Trontelj, P., Fiser, C., 2009. Cryptic species diversity should not be trivialised. *Syst. Biodivers.* 7, 1-3.

Turan, C., Caliskan, M., Kucuktas, H., 2005. Phylogenetic relationships of nine mullet species (Mugilidae) in the Mediterranean Sea. *Hydrobiol.* 532, 45-51.

- Turner, G.F., 1999. What is a fish species? *Rev. Fish Biol. Fisheries* 9, 281-297.
- Viñas, J., Alvarado Bremer, J., Pla, C., 2004. Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Mar. Biol.* 145, 225-232.
- Ward, R.D., 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Res.* 9, 1077-1085.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 360, 1847-1857.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737-738.
- White, B.N., Lavenberg, R.J., McGowen, G.E., 1984. Atheriniformes: development and relationships. In: Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W., Jr, Richardson, S.L. (Eds.), *Ontogeny and systematics of fishes*. *Am. S. Ichthyol. Herpetol., Spec. Publ.*, 1, 355-362.
- Wiens, J.J., 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Syst. Biol.* 53, 653-661.
- Wiley, E.O., 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27, 17-26.
- Wiley, E.O., 1981. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley and Sons, New York, 439 pp.
- Wiley, E.O., 2002. On species and speciation with reference to the fishes. *Fish and Fisheries* 3, 161-170.
- Wiley, E.O., Johnson, G.D., Dimmick, W.W., 2000. The interrelationships of Acanthomorph fishes: a total evidence approach using molecular and morphological data. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 319-350.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. John Hopkins University Press, Baltimore, 142 pp.
- Wu, K.Y., Shen, S.C., 2004. Review of the teleostean adductor mandibulae and its significance to the systematic position of the Polymixiiformes, Lampridiformes, and Triacanthoidei. *Zool. Stud.* 43, 712-736.

Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371-373.

Yoshizaki, G., Yamaguchi, K., Oota, T., Strüssmann, C.A., Takashima, F., 1997. Cloning and characterization of pejerrey mitochondrial DNA and its application for RFLP analysis. *J. Fish Biol.* 51, 193-203.

Zharkikh, A., 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 39, 315-329.

