



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO - PPGGBC

ANÁLISE GENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIMITE DE DISTRIBUIÇÃO E
EVENTUAIS ZONAS DE CONTATO EM PEIXES DO GÊNERO *Macrodon*
(PERCIFORMES, SCIAENIDAE) DA COSTA BRASILEIRA

ALEXANDRE FALCÃO ADERNE

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Jequié-BA
2017

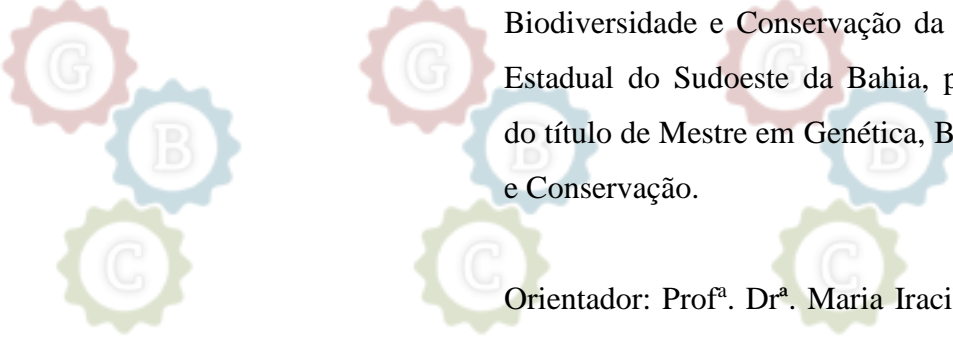
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



ALEXANDRE FALCÃO ADERNE

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ANÁLISE GENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIMITE DE DISTRIBUIÇÃO E
EVENTUAIS ZONAS DE CONTATO EM PEIXES DO GÊNERO *Macrodon*
(PERCIFORMES, SCIAENIDAE) DA COSTA BRASILEIRA**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Iracilda da Cunha Sampaio

Co-orientadores: Prof. Dr. Paulo Roberto A. de Mello Affonso e Prof^a Dr^a Jamille de Araújo Bitencourt



Jequié-BA

2017



A447a Aderne, Alexandre Falcão.

Análise genética para identificação de limite de distribuição e eventuais zonas de contato em peixes do gênero *Macrodon* (Perciformes, Sciaenidae) da costa brasileira / Alexandre Falcão Aderne.- Jequié, 2017.

86f

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dr^a. Maria Iracilda da Cunha Sampaio e Co-orientadores Prof. Dr. Paulo Roberto A. de Mello Affonso e Prof^a Dr^a Jamille de Araújo Bitencourt.)

1. Biogeografia 2. Diversidade genética 3. Filogenia 4. Filogeografia 5. Pesca I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 578.09

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Análise genética para identificação de limite de distribuição e eventuais zonas de contato em peixes do gênero *Macrodon* (Perciformes, Sciaenidae) da costa brasileira”.

Autor (a): Alexandre Falcão Aderne

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio

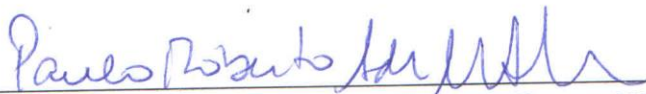
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio - UFPA/Belém



Prof. Dr. Horácio Schneider – UFPA/Belém



Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso - UESB/Jequié

Data de realização: 31 de agosto de 2017.

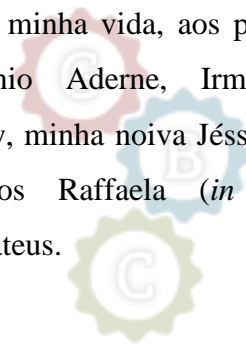
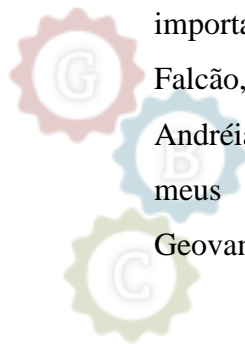


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, aos pais, Verônica Falcão, Eugênio Aderne, Irmãos, Danile, Andréia e Tony, minha noiva Jéssica Nery e os meus sobrinhos Raffaella (*in memoriam*), Geovanna e Mateus.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão de 12 meses de bolsa.

A minha orientadora, por toda ajuda na realização deste trabalho, e por ter me aceitado como orientando, mesmo não conhecendo o meu trabalho e estarmos tão distantes um do outro.

Ao meu co-orientador Paulo Affonso, por toda paciência, dedicação, troca de experiência, ensinamentos e muito mais!!! Você é um exemplo de profissionalismo, e nesses quase três anos que trabalhamos sua contribuição foi significativa (99% de confiabilidade) para minha aprendizagem.

A minha co-orientada Jamille Bitencourt (Ivete), com quem aprendi quase tudo que sei sobre técnicas de biologia molecular... Desculpe por todas as discussões, e obrigado por ser paciente e por cada minuto dedicado para minha formação. Hoje posso dizer que você é muito mais que uma co-orientadora, mas uma amiga, e para finalizar “Minha sorte grande, foi você cair do céu [...] Poeira, Poeira, Poeira, levantou, levantou poeira!!!!”.

À UESB e ao PPGGBC pela oportunidade de fazer uma pós-graduação e pelo espaço para a realização de todas as atividades práticas da pesquisa.

À UFPA pela ajuda no seqüenciamento das minhas amostras.

Aos pescadores que me ajudaram nas coletas, sem vocês esse trabalho não seria realizado e ao dono da pousada de Barra do Saí em Aracruz.

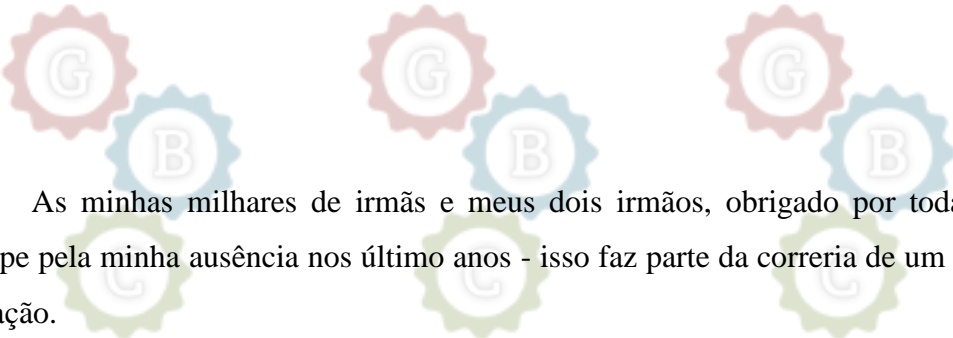
A todos que me ajudaram nas análises de dados do presente neste trabalho, Paulo Affonso, Jamille Bitencourt, Henrique Batalha, Sâmela Mendes, e Márcia Anjos.

À banca, Iracilda Sampaio, Horácio Schneider e Paulo Affonso, que aceitaram analisar este trabalho.

A todos os mestres pelos seus ensinamentos, principalmente aos professores doutores Paulo Affonso, Marcelo Cervini, Ana Maria, Carlos Malhado, Paulo Carneiro, Henrique Batalha e Jamille Bitencourt.

À prof^a Dr^a Débora Diniz e prof^a Dr^a Marluce Barretto por ter me apresentado a ictiologia e o mundo da pesquisa científica e à Fabilene Paim pelos meus primeiros aprendizados no laboratório de citogenética.

Aos meus Pais, Verônica Falcão e Eugênio Aderne, que foram as pessoas que mais contribuíram para que eu chegasse até aqui; obrigado por todo o incentivo, investimento, e por todo amor dedicado a mim, nesses últimos três anos, e por toda minha vida. Amo vocês!!!



As minhas milhares de irmãs e meus dois irmãos, obrigado por toda conversa e, desculpe pela minha ausência nos últimos anos - isso faz parte da correria de um aluno de pós-graduação.

A minha princesa, amor, Noiva Jéssica Nery, obrigado por todas as conversas, pela paciência, e por ter ouvido todas as minhas reclamações e vitórias no decorrer das atividades de pesquisa. Você foi a pessoa que de forma indireta fez mestrado junto comigo, pois estava do meu lado desde o processo seletivo até a escrita deste trabalho.

A minha sogra, Vilma, com suas palavras de sabedoria, mesmo falando que a minha formatura não é lá das melhores, mas que sempre me apoiou a crescer e ter sucesso na minha profissão seja como professor ou pesquisador.

Aos meus amigos e irmãos Luã da Guarda e Silas Guimarães - obrigado pelo incentivo, resenhas, pelas saídas, e por todo copo de cerveja.

Aos meus colegas do LabCito, em especial ao grupo do cardume, Paulo (o grande chefão), Jámille, Marcia, Sheila, Leo Argolo, Leo Aragão, Silvinha, Aline, Fabi, Josi, Débora, Lands, Rayana, Ricardo, Lídia e Fernando (agregados), Lisi, Luan, Noel e Hannah - obrigado pela troca de experiência e convivência.

A minha turma do mestrado, vocês são mil e foi muito bom trabalhar com vocês nas disciplinas e na realização do VI WGBC (Workshop de Genética, Biodiversidade e Conservação). No final das contas, valeu a pena ter participado da comissão organizadora, pois foi show. Todos da turma são gratos à Prof^a Dra. Ana Maria Waldschmidt por ter aceitado o convite para ser a coordenadora do evento.

Aos meus colegas do Educandário St^a Therezinha, principalmente a minha coordenadora pedagógica Graciela Almeida (Gracinha do arrocha), por ter me ajudado nos horários das aulas, para não dar conflito com as disciplinas do mestrado.

E por fim, sou grato à toda força que a natureza tem proporcionado a continuar a lutar pelos meus objetivos.





BIOGRAFIA

Alexandre Falcão Aderne nasceu em Jequié-BA em 23/04/1987. Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (2014) e cursou Mestrado no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética, biodiversidade e conservação pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (2015-Atual). Atualmente é professor da educação básica das disciplinas de Ciências e Biologia no Educandário St^a Therezinha. Tem experiência na docência e nas áreas de Biologia Molecular e Citogenética animal, atuando principalmente nos seguintes temas: filogenia, filogeografia, ictiologia e marcadores cromossômicos.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



“Só a dúvida salva.”
Millôr Fernandes

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

A família Sciaenidae compõe um grupo de peixes originado no fim do Jurássico e início do Cretáceo, por volta de 208 milhões de anos atrás. Atualmente, essa família é representada por 67 gêneros e 283 espécies, predominantes em ambientes marinhos e estuarinos. Entre eles, estão as espécies costeiras *Macrodon ancylodon* e *Macrodon atricauda*, que por muito tempo foram consideradas uma única espécie, *M. ancylodon*, com ampla distribuição no Atlântico Sul ocidental. Porém, estudos genéticos e morfológicos separaram o táxon, revalidando a denominação *M. atricauda* para as populações da região sudeste e sul do Brasil e mantendo o termo *M. ancylodon* para o grupo do Norte e Nordeste. Aparentemente, essas espécies estariam isoladas geograficamente entre o litoral do Espírito Santo e sul da Bahia, propostos como limites norte e sul da distribuição de *M. atricauda* e *M. ancylodon*, respectivamente. No entanto, as amostragens de populações dessas espécies nessa região limítrofe são escassas e com lacunas entre grandes distâncias geográficas. Visando testar a hipótese de existência de zona de contato e/ou introgressão entre *M. ancylodon* e *M. atricauda*, assim como determinar os fatores biogeográficos que influenciaram os padrões de distribuição atual, análises filogenéticas e de estruturação populacional utilizando três marcadores mitocondriais (rDNA 16S, COI e CYT-B) e dois nucleares (tolueno-4-monooxigenase - TMO-4C4 e rodopsina - RHO) foram realizadas em ambas as espécies oriundas de diversos pontos ao longo da costa sul da Bahia até o Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil). Observamos a partir dos dados dos genes mitocondriais que *M. ancylodon* e *M. atricauda* são espécies reciprocamente monofiléticas com divergência estimada no Pleistoceno (1,5 milhões de anos atrás). A separação das populações ancestrais poderia estar relacionada ao recuo do nível mar no período glacial, levando ao isolamento por vicariância e especiação de *Macrodon* entre a região nordeste e sudeste do Brasil devido à exposição da plataforma de Abrolhos (sul da Bahia) e da cadeia da Vitória-Trindade, favorecida por diferenças ecológicas entre as regiões. Ao contrário de estudos prévios, populações simpátricas de *M. atricauda* e *M. ancylodon* foram encontradas entre os estuários de Mucuri/BA e Conceição da Barra/ES. Assim, inferimos que a transgressão marinha após os eventos glaciais proporcionou a dispersão populacional das duas espécies, levando ao contato secundário nos limites norte e sul de distribuição de cada espécie. Com base nos marcadores utilizados não foi possível visualizar eventos de hibridação, o que precisa ser confirmado em estudos futuros. A diversidade genética entre as populações de cada espécie foi heterogênea, com maior variabilidade nas populações mais ao sul e norte da costa brasileira, sugerindo que essas regiões sejam o centro de origem de *M. atricauda* e *M. ancylodon*, respectivamente. Apesar dos sinais de expansão populacional histórica em ambas as espécies, *M. ancylodon* mostrou indícios de redução populacional recente. Portanto, as políticas de conservação de recursos pesqueiros devem considerar a diversidade e o intrincado padrão de distribuição das populações de *Macrodon* e as diferenças genéticas entre as populações no manejo de ambas as espécies do litoral brasileiro.

Palavras-chave: Biogeografia, Diversidade Genética, Filogenia, Filogeografia, Pesca.



ABSTRACT

The family Scianidae comprises a fish group firstly arisen in Late Jurassic and Early Cretaceous, around 208 million years ago. Currently, this family is represented by 67 genera and 283 species, usually found in marine and estuarine environments. The coastal species *Macrodon ancylodon* and *Macrodon atricauda* represent two Scianidae taxa that have been regarded as a single and widespread species, *M. ancylodon*, from Western South Atlantic. However, genetic and morphological studies have separated this taxon, by revalidating *M. atricauda* for the populations from Southern and Southeastern coast of Brazil, while *M. ancylodon* was valid only for the populations from Northern and Northeastern Brazil. Apparently, both species would be geographically isolated between the coast of Espírito Santo and Southern Bahia, considered the northern and southern range boundaries of *M. atricauda* and *M. ancylodon*, respectively. Nonetheless, the sampling of *Macrodon* populations along these range limits is scarce, with gaps throughout large geographic distances. To test the hypothesis of a putative contact zone and/or introgression between *M. ancylodon* and *M. atricauda*, as well as to determine the biogeographic boundaries underlying the current distribution pattern, phylogenetic and population structure analyses based on three mitochondrial markers (rDNA 16S, COI, and CYT-B) and two nuclear genes (toluene-4-monooxygenase - TMO-4C4 and rhodopsin - RHO) were carried out in both species from several collection sites from Southern Bahia to Rio de Janeiro coast (Southeastern Brazil). Based on mitochondrial gene data, we showed that *M. ancylodon* and *M. atricauda* are reciprocally monophyletic species with divergence estimated in Pleistocene (1.5 million year ago). The separation of ancestor populations could be related to sea-level retraction during glacial period, thus leading to isolation by vicariance and speciation in *Macrodon* between Northeastern and Southeastern Brazil by the exposure of Abrolhos bank (Southern Bahia) and Vitoria-Trindade seamount chain, favored by ecological differences between both regions. Contrary to previous reports, sympatric populations of *M. atricauda* and *M. ancylodon* were detected between the estuaries of Mucuri River/BA and Conceição da Barra/ES. Therefore, we infer that marine transgression after glacial events has allowed the population dispersal of both species, determining their secondary contact in region between the southern and northern range limits of each species. Hybridization events could not be identified by the analyzed markers, what remains to be evaluated in further studies. The genetic diversity among populations of each species was heterogeneous, with greater variation in southern and northern coasts, indicating that these would be the origin center of *M. atricauda* and *M. ancylodon*, respectively. In spite of signs of historical population expansion in both species, *M. ancylodon* revealed recent bottleneck. Thus, the conservation policies of fishery resources should take into account the complex distribution pattern of *Macrodon* populations and the genetic distinctiveness in the management of both species from the Brazilian coast.

Keywords: Biogeography, Genetic Diversity, King Weakfish, Phylogenetics, Phylogeography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Províncias biogeográficas e principais barreiras zoogeográficas no Oceano Atlântico Tropical. IP = Istmo do Panamá; AOP = Pluma do Orinoco-Amazonas; MAB = Cordilheira Meso-Atlântica; BB = Corrente de Benguela (Luiz Jr. *et al.*, 2012). 22
- Figura 2.** Relação filogenética da supraordem Percomorpharia (Betancur *et al.*, 2013). A seta indica a família Sciaenidae. 26
- Figura 3.** Filogenia dos Sciaenidae do Atlântico Sul ocidental proposta por Santos *et al.* (2013). 28
- Figura 4.** Distribuição de *Macrodon ancylodon* (amarelo) e *Macrodon atricauda* (verde) (Carvalho-Filho *et al.*, 2010). 29
- Figura 5.** Fotografia dos exemplares de *Macrodon ancylodon* (A) e *Macrodon atricauda* (B). 36
- Figura 6.** Pontos de coleta das espécies inicialmente identificadas como *Macrodon ancylodon* na Bahia (Valença, Itacaré, Ilhéus e Mucuri) e *Macrodon atricauda* no Espírito Santo (Aracruz e Conceição da Barra) e no Rio de Janeiro (Macaé). 37
- Figura 7.** Perfil eletroforético dos gradientes de temperatura e concentração de MgCl₂ (0,7 µl = 2,3 mM; 0,8 µl = 2,6 mM; 0,9 µl = 3 mM; 1,0 µl = 3,3 mM) na amplificação do COI. A seta vermelha mostra as temperaturas e a concentração de MgCl₂ escolhidas para a amplificação. 40
- Figura 8.** Perfil eletroforético para o gene de COI (A), CYT-B (B), RNAr 16S (C) e RHO (D). Foram selecionados quatro indivíduos das amostras de amplificação por gene, onde os dois primeiros poços representam amostras de *M. ancylodon* e os dois últimos são amostras de *M. atricauda*. 41
- Figura 9.** Perfil eletroforético para o gene de TMO-4C4. Os oito primeiros poços a partir da esquerda incluem amostras de *M. ancylodon* enquanto os demais representam *M. atricauda*. 41
- Figura 10.** Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial 16S. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Isopisthus parvipinnis* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*. 47
- Figura 11.** Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de Neighbor-Joining (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial COI. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Isopisthus parvipinnis*, 2 = *Cynoscion virescens* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*. 48

Figura 12. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial CYT-B. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Cynoscion reticulatus* e 3 = *Cynoscion regalis*.

49

Figura 13. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador nuclear TMO-4C4. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Isopisthus parvipinnis* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*

59

Figura 14. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador nuclear RHO. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Isopisthus parvipinnis* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*

51

Figura 15. Área de distribuição para *Macrodon ancylodon* (amarelo) e *M. atricauda* (azul) descrita por Carvalho-Filho *et al.* (2010), com a inclusão da nova área de simpatria (verde) para as duas espécies entre Mucuri/BA e Conceição da Barra/ES identificada nesse estudo.

52

Figura 16. Árvore filogenética com tempo de divergência em milhares de anos (mya) para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda*, baseada em nos genes mitocondriais 16S, COI e CYT-B concatenados, estimada pela análise Bayesiana coalescente. As barras em azul representam 95% de HPD (*Highest posterior densities*). O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Cynoscion reticulatus* e 3 = *Cynoscion regalis*.

56

Figura 17. Variação de diversidade de nucleotídeo baseada nas tabelas 8 a 10 para os pontos amostrados. Em azul claro está indicada a distribuição de *M. ancylodon*, em amarelo claro, a distribuição de *M. atricauda* e verde claro representa a região de simpatria. As barras representam os genes 16S (azul escuro), COI (vermelho) e CYT-B (verde escuro).

59

Figura 18. Real distribuição da diversidade de nucleotídeo para *M. ancylodon* e *M. atricauda* ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Em azul claro, está indicada a distribuição de *M. ancylodon*, em amarelo claro, a distribuição de *M. atricauda* e, em verde claro, está representada a região de simpatria. As barras representam os genes 16S (azul escuro), COI (vermelho) e CYT-B (verde escuro).

59

Figura 19. Diversidade de nucleotídeo para CYT-B ao longo da área de distribuição para *M. ancylodon* e *M. atricauda* no Atlântico Sul Ocidental com base nos dados de presente estudo (BAVA até RJMA) e publicados por Santos *et al.* (2006) (VE até PE e SP até ARG) e dados do presente trabalho (BAVA-RJMA). Em azul claro, indica-se a distribuição de *M. ancylodon*, em amarelo claro a distribuição de *M. atricauda* e, em verde claro, a região de contato. (VE - Venezuela; AP - Amapá; PA - Pará; MA - Maranhão; PE - Pernambuco; SP - São Paulo; PR - Paraná; SC - Santa Catarina; RS - Rio Grande do Sul e ARG - Argentina). 60

Figura 20. Rede de haplótipos para os marcadores mitocondriais 16S (A), COI (B) e CYT-B (C) para *M. ancylodon* e *M. atricauda*. A coloração indica as localidades amostradas e o tamanho do círculo reflete a proporção individual dos haplótipos. 64

Figura 21. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para 16S (A), COI (B) e CYT-B (C) considerando *M. ancylodon*+*M. atricauda* (verde), *M. ancylodon* (azul) e *M. atricauda* (vermelho), separadamente. 65

Figura 22. Análise de estruturação populacional por inferência Bayesiana (BAPS) para 16S, COI e CYT-B em *M. ancylodon*+*M. atricauda* (esquerda), *M. ancylodon* (centro) e *M. atricauda* (direita). Na coluna da esquerda as cores vermelho e verde indicam os espécimes de *M. atricauda* e *M. ancylodon*, respectivamente. No caso das análises em *M. ancylodon* e *M. atricauda* isoladamente, as cores predominantes indicam indivíduos que não apresentam diferenças genéticas significativas entre as localidades. 67

Figura 23. Correlação entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) para amostras de *M. ancylodon* + *M. atricauda* (A) ($r = 0,7465$; $P = 0,99$), *M. ancylodon* (B) ($r = -0,1153$; $P = 0,56$) e *M. atricauda* (C) ($r = 0,8679$, $P = 0,77$). 68

Figura 24. Estimativa de tamanho efetivo (NE) histórico pela análise de *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBS) para *M. ancylodon* (A) e *M. atricauda* (B). A linha em preto representa a mediana da estimativa e a área em roxo indica os limites superiores e inferiores de 95% de HDP (*Highest Posterior Density*). 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das localidades e amostragem (N) de espécies de *Macrodon* no litoral nordeste e sudeste do Brasil. 37

Tabela 2. Condições de PCR para cada marcador molecular utilizado. 38

Tabela 3. Condições de PCR para os marcadores moleculares mitocondriais (RNAr 16S, CYT-B e COI) e nucleares (ROD e TMO-4C4) para as espécies de *M. ancylodon* e *M. atricauda*. 39

Tabela 4. Código de sequências utilizadas para polarização das árvores filogenéticas obtidas *GenBank*. 43

Tabela 5. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o gene de rRNA 16S. 53

Tabela 6. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o marcador COI. 53

Tabela 7. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o marcador CYT-B.	54
Tabela 8. Teste de diversidade e neutralidade em <i>Macrodon ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> com 16S.	57
Tabela 9. Teste de diversidade e neutralidade em <i>Macrodon ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> com COI;	58
Tabela 10. Teste de diversidade e neutralidade em <i>Macrodon ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> com CYT-B.	58
Tabela 11. Estruturação populacional (F_{ST}) para <i>M. ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> com os marcadores mitocondriais 16S, COI e CYT-B.	61
Tabela 12. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador 16S para <i>M. ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.	62
Tabela 13. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador COI para <i>M. ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.	62
Tabela 14. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador CYT-B para <i>M. ancylodon</i> e <i>M. atricauda</i> entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.	63
Tabela 15. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene 16S para <i>M. ancylodon</i> , <i>M. atricauda</i> e <i>M. ancylodon+M. atricauda</i> (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .	66
Tabela 16. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene COI para <i>M. ancylodon</i> , <i>M. atricauda</i> e <i>M. ancylodon+M. atricauda</i> (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .	66
Tabela 17. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene CYT-B para <i>M. ancylodon</i> , <i>M. atricauda</i> e <i>M. ancylodon+M. atricauda</i> (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .	66

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SIMBOLOS

A = Adenina

AMOVA = Análise de Variância Molecular

AOP = Pluma do Orinoco-Amazonas

BAIL = Ilhéus – BA

BAIT = Itacaré-BA

BAMU = Mucuri-BA

BAMU/MAC = Mucuri-BA *Macrodon ancylodon*

BAMU/MAT = Mucuri-BA *Macrodon atricauda*

BAP = Porto Seguro

BAPS = *Bayesian Analysis of Population Structure*

BAVA = Valença-BA

BB = Corrente de Benguela

BEAST = *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*

BEAUti = *Bayesian Evolutionary Analysis Utility*

BI = Inferência Bayesiana

C = Citosina

CEUA/UESB = Comitê de Ética No Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

CF = Concentração final

CI = Concentração inicial

CIPRES = *Cyber Infrastructure for Phylogenetic Research*

COI = Citocromo oxidase subunidade I

CYT-B = Citocromo b

D = D de Tajima

ESAR = Aracruz-ES

ESCB = Conceição da Barra-ES

ESCB/MAC = Conceição da Barra-ES *Macrodon ancylodon*

ESCB/MAT = Conceição da Barra-ES *Macrodon atricauda*

Fs = Fs de Fu

G = Guanina

GRPs = Proteínas de reconhecimento de gametas

H = Número de haplótipo

Hd = Diversidade de Haplótipo

ICMBio = Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IP = Istmo do Panamá

IUPAC = *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K = Números de grupos formados.

K-2P = Kimura 2-parâmetros

MAB = Cordilheira Meso-Atlântica

MAC = *Macrodon ancylodon*

MARJ = Macaé-RJ

MAT = *Macrodon atricauda*

MCMC = Cadeias Markov de Monte Carlo

MEGA = *Molecular Evolutionary Generics Analysis*

ML = Máxima verossimilhança

N = Número de espécie

NCBI = *National Center for Biotechnology information*

NJ = *Neighbor-Joining*

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PF = *Primer F*

Pop. = população

Pops. = Populações

PR = *Primer R*

R2 = teste de Ramos-Onsins & Rosa (2002).

Reag. = Reagentes

RHO = Rodopsina

S = Sítios polimórficos

SAMOVA = Análise de variância molecular espacial

SISBIO = sistema de autorização e informação em biodiversidade

T = Timina

TMO-4C4 = Tolueno-4-monooxigenase

V = Volume

VF = Volume final

II = Diversidade nucleotídica



LISTA DE PROGRAMAS

ARLEQUIN v. 3.01 – Análise da AMOVA e F_{ST} par-a-par;

BAPS v. 6.0 – Gráfico de estruturação populacional;

BEAST v. 1.8.4– Análise de árvore filogenética calibrada e *Bayesian Skyline Plot*;

BEAUti v. 1.8.4 – Gerar arquivos de entrada para o BEAST;

BioEdit v. 7.2.6.1 – Edição e alinhamento das sequências nucleotídica.

CIPRES v. 3.3 – Plataforma online para análises das árvores filogenéticas;

Diva-Gis v. 7.5 – Construção de Mapas;

DnaSP v. 5.10.01 – Estatística sumária e teste de neutralidade;

Geographic Distance Matrix Generator v. 1.2.3 – Gerar Matriz de distância geográfica;

Inkscape v.3 e **Paint** – Edição de mapas e figuras;

Isolation By Distance web Service v. 3.23 – Teste de Mantel (Mantel, 1967);

jModeltest v. 2.1.10 – Determinar modelo evolutivo para as inferências filogenéticas;

MEGA v. 7.0.26-1– Análise de distância par-a-par, árvore de *Neighbor-Joining*, composição de bases e sítios polimórficos;

Microsoft Office Excel 2007 – Construção de arquivo de entrada para outros programas;

MrBayes on (XSEDE) v. 3.2.6 – Inferência Bayesiana;

PopArt v. 1.7 – Construção de rede de haplótipo;

RAxML-HPC (Blackbox) v. 8.2.10 – Inferência filogenética por Máxima verossimilhança;

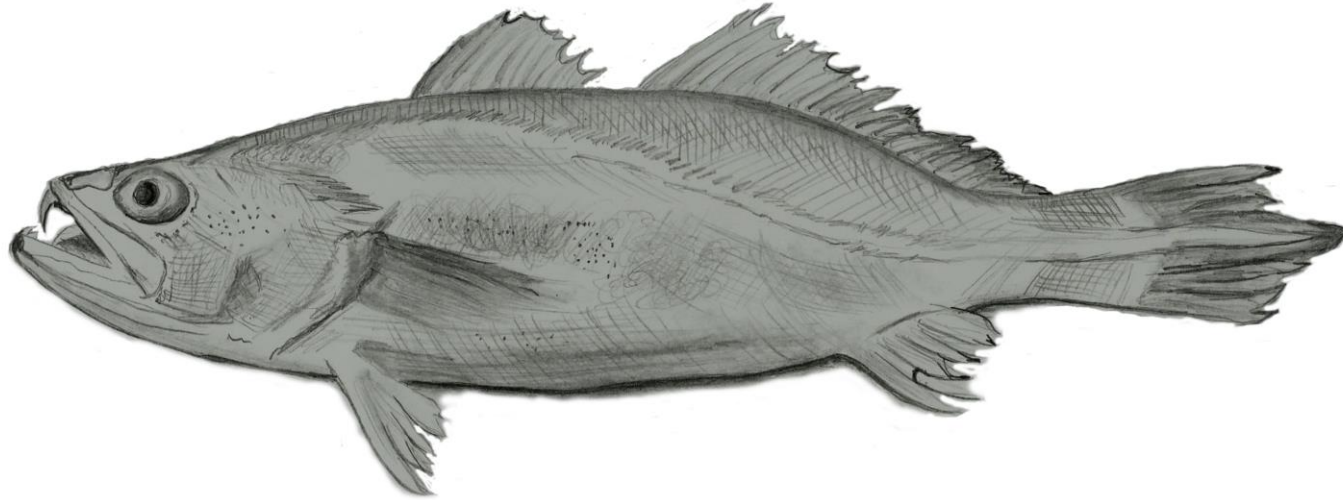
SAMOVA v. 1.0 – Análise da SAMOVA.



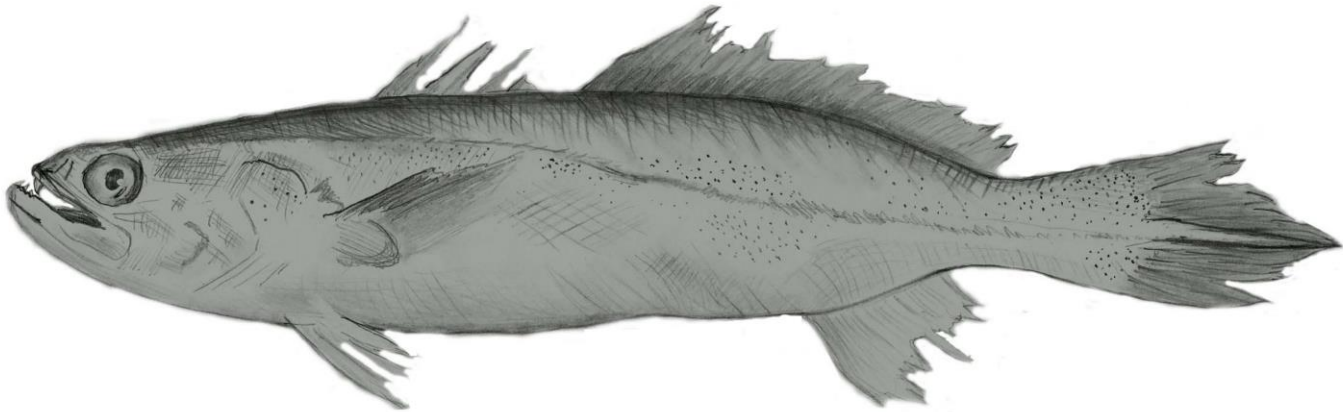
SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Províncias do Atlântico Sul e plataforma continental brasileira	22
2.2	A família Sciaenidae	25
2.3	O gênero <i>Macrodon</i> no Atlântico Sul	28
2.4	Barreiras geográficas, especiação e hibridação	30
3.	OBJETIVO	35
3.1	Objetivos Específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Amostragem e extração de DNA	36
4.2	Condições de PCR	38
4.3	Edição e verificação de sequência	42
4.4	Análise de distância e árvore de <i>Neighbor-Joining</i>	42
4.5	Análise filogenética e tempo de divergência	42
4.6	Estatística sumária e análise demográfica	43
4.7	Teste de estrutura genética	44
4.8	Construção e edição de mapas e figuras	45
5.	RESULTADOS	46
5.1	Análise das sequências	46
5.2	Análise de distância genética e árvore de <i>Neighbor-Joining</i>	46
5.3	Análises filogenéticas e tempo de divergência	55
5.4	Estatística sumária	55
5.5	Estrutura genética	60
5.6	Estimativa de expansão populacional	69
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÕES	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Macrodon ancylodon



Macrodon atricauda



Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

1. INTRODUÇÃO

A família Sciaenidae é um grupo de peixes com grande riqueza de espécies costeiras e estuarinas e ampla distribuição geográfica, muitas delas reconhecidas por sua importância econômica. Dentre elas, *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda*, endêmicas da região Sul-Americana ocidental, apresentam diferenças anatômicas sutis, o que dificulta sua identificação apenas com base na morfologia externa. Como consequência, ambas foram consideradas, por muito tempo, como uma única espécie (*M. ancylodon*) amplamente distribuída no Atlântico Sul Ocidental.

Contudo, trabalhos filogenéticos e populacionais recentes demonstraram uma descontinuidade genética entre as populações de *M. ancylodon*, propondo a formação de dois grupos, com distribuição alopátrica, abrangendo respectivamente as regiões Sul - Sudeste e Norte – Nordeste da costa brasileira. Posteriormente, um trabalho com base em dados morfológicos e merísticos revalidaram a nomenclatura de *M. atricauda* como o clado subtropical (Espírito Santo até a Argentina) e manteve *M. ancylodon* para o clado Tropical (Bahia até a Venezuela).

De fato, a literatura reporta que o extremo sul da costa central do Brasil é uma região de transição zoogeográfica. A presença de barreiras geográficas naturais próximas a essa zona causa um desvio no fluxo de correntes gerando diferenças hidrodinâmicas e gradientes ambientais ao longo do litoral, o que pode explicar os padrões de fragmentação genética entre as populações e especiação ecológica. Adicionalmente, a interação com diferenças de temperatura e salinidade da água, história de vida das larvas e a hidrodinâmica costeira influenciam na conectividade entre populações. Tais fatores podem ser ainda mais preponderantes na determinação do perfil filogeográfico de populações de espécies estuarino-dependentes, visto que regiões próximas à costa sofrem efeitos de ondas de superfície, marés e escoamento de água doce, afetando diretamente o sucesso larval nos estuários e promovendo uma distribuição assimétrica.

Nesse contexto, as espécies *M. ancylodon* e *M. atricauda*, estreitamente relacionadas, representam bons modelos para entender a influência dos fatores ambientais responsáveis pelo cenário de distribuição atual. Ainda, a ausência de dados de coexistência local de ambas as espécies representa uma excelente oportunidade para testar a hipótese de existência de zona de contato e/ou mistura de haplótipos, assim como determinar o ponto de quebra filogeográfica e os limites de distribuição das mesmas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Províncias do Atlântico Sul e plataforma continental brasileira

Com base na distribuição de espécies endêmicas, os biogeógrafos determinam áreas de endemismo ou províncias (Briggs & Bowen, 2012). Para a porção tropical do Atlântico Ocidental, são conhecidas quatro províncias: Caribe, Brasil, Cordilheira Meso-Atlântica e Atlântico Oriental (Briggs, 1974; Floeter *et al.*, 2008). Estudos com grupos de peixes recifais demonstraram flutuabilidade na riqueza de espécies das províncias do Atlântico Sul, com maior concentração de espécies e endemismo na região caribenha, seguida pela costa brasileira (Floeter *et al.*, 2008).

As províncias do Atlântico Sul tropical são separadas por cinco grandes barreiras biogeográficas: a largura do próprio Atlântico (Pittman *et al.*, 1993; Luiz Jr. *et al.*, 2012); o fechamento da via marítima de Tétis (Bellwood & Wainwright, 2002); o fluxo de águas dos rios Orinoco e Amazonas (Luiz Jr *et al.*, 2012); a formação do Istmo do Panamá (Steeves *et al.*, 2005); e a corrente fria de Benguela (Henriques *et al.*, 2014) (Fig. 1).

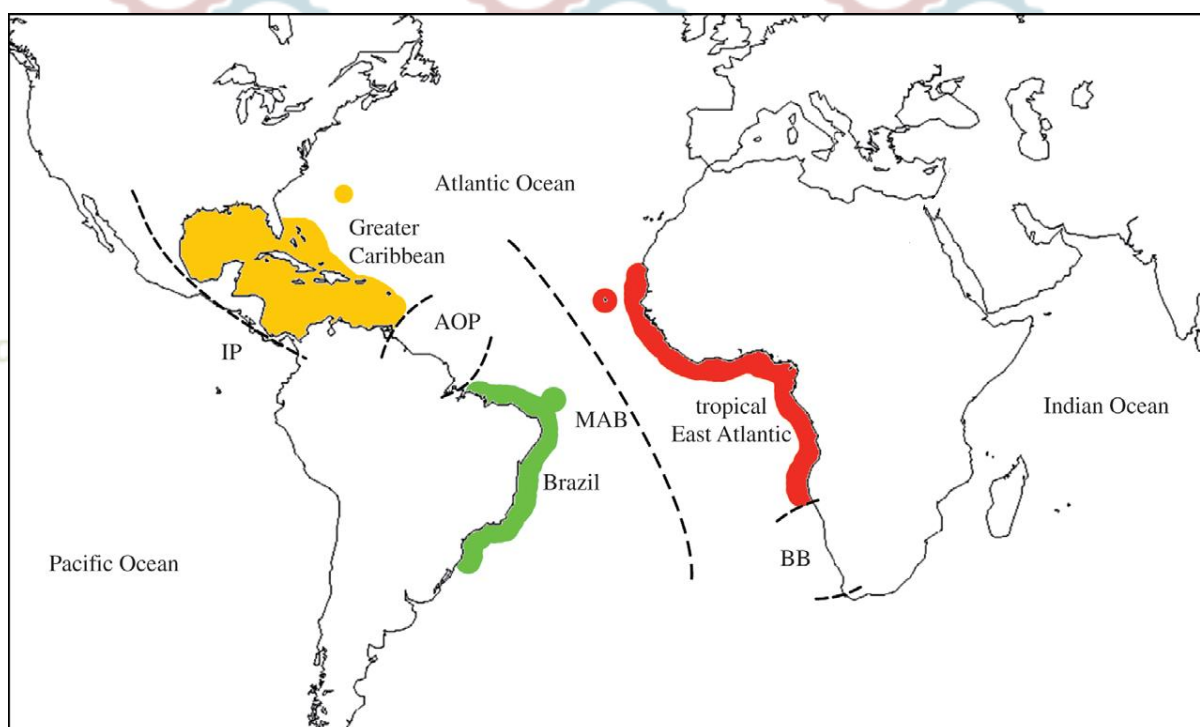


Figura 1. Províncias biogeográficas e principais barreiras zoogeográficas no Oceano Atlântico Tropical. IP = Istmo do Panamá; AOP = Pluma do Orinoco-Amazonas; MAB = Cordilheira Meso-Atlântica; BB = Corrente de Benguela (Luiz Jr. *et al.*, 2012).

As barreiras supracitadas podem explicar a divergência e diversificação de peixes costeiros. Por exemplo, as populações da espécie estuarina *Atractoscion aequidens* (Teleostei, Scianidae) do norte e sul da costa Atlântica Oriental na África são separadas devido à

influência da corrente fria de Benguela (Henriques *et al.*, 2014). Nesse caso, o não compartilhamento de haplótipos entre as populações refletem isolamento estabelecido no Pleistoceno, sugerindo especiação ecológica e justificando uma revisão taxonômica do grupo (Henriques *et al.*, 2014). Por outro lado, devido a sua capacidade de dispersão, e de adaptação em diversos habitats (Luiz Jr. *et al.*, 2012), diversas espécies conseguem transpor essas barreiras. Nesse sentido, já foram observados juvenis e adultos de certas espécies recifais do Atlântico Sul Ocidental que se dispersam através da barreira da cordilheira Meso-Atlântica associados a folhas e detritos flutuantes. Do mesmo modo, espécies com tolerância a diferentes níveis de salinidade podem se deslocar entre as barreiras dos rios Orinoco e Amazonas (Luiz Jr. *et al.*, 2012).

Especificamente, a província brasileira é subdividida em duas grandes regiões: Nordeste do Brasil (tropical) a qual abrange a área desde a foz do rio Amazonas até o Sul da Bahia; e Sudeste do Brasil (subtropical) do Espírito Santo ao Sul de Santa Catarina, (Briggs, 1974). A principal barreira descrita entre as províncias brasileiras é a temperatura, pois entre Espírito Santo e Cabo Frio no Rio de Janeiro há o fenômeno da ressurgência, trazendo águas profundas frias e ricas em nutrientes para a superfície. Essa ruptura no gradiente de temperatura e de níveis de produtividade parecem ser fatores limitantes na distribuição e diversificação de diversas espécies de mar aberto e estuarinas da costa brasileira (Santos *et al.*, 2006; Carvalho-filho *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Essas diferenças ambientais entre as subprovíncias do Nordeste e Sudeste brasileiro tem sido associadas ao isolamento ecológico e restrições ao fluxo gênico de espécies estuarinas da família Sciaenidae, como no gênero *Macrodon* (Santos *et al.*, 2006), *Ophioscion punctatissimus* (Barbosa *et al.*, 2014) e *Larimus breviceps* (Santos *et al.*, 2013). O mesmo cenário tem sido observado em outros grupos de peixes ósseos como *Bagre bagre* (Silva *et al.*, 2016)

Novamente, esse padrão não se aplica a todas as espécies, como observados nas espécies da família Labridae do gênero *Halichoeres* que ocorrem no Atlântico Sul Ocidental, cujas espécies da mesma província são mais distante geneticamente que espécies de províncias diferentes (Rocha *et al.*, 2005). Isso é devido à dispersão alopátrica por especiação ecológica, em que espécies mais generalistas são mais homogêneas, mesmo ocorrendo em província diferentes, como observado entre *Halichoeres radiatus* (Caribe e Fernando de Noronha) e *H. bivittatus* (Bahamas e Flórida) (Rocha *et al.*, 2005). Diferentemente, espécies mais especialistas possuem uma distância genética maior mesmo dentro de uma única

província, como pode ser visto nas espécies irmãs *H. radiatus*, *H. brasiliense* (Brasil) e *H. maculipinna* (Brasil e Caribe) (Rocha *et al.*, 2005).

Outra diferença marcante ao longo da extensa costa brasileira (mais de 8.500 km) (MMA, 2017) é a largura da plataforma continental, a qual pode variar de 8 a 370 km, sendo mais estreita na região Nordeste e mais larga na foz do rio Amazonas (região Norte) e Sul e Sudeste do Brasil (Miloslavich *et al.*, 2011). A profundidade também pode variar entre quatro a 11 mil metros (MMA, 2017), com uma maior inclinação na região Nordeste e Sudeste (Miloslavich *et al.*, 2011).

Geomorfologicamente, a costa brasileira ainda é dividida em cinco grandes regiões (região Norte, Nordeste, Leste ou Oriental, Sudeste e Sul), as quais, por sua vez, são subdivididas em macrocompartimentos (Cunha & Guerra, 2003). A região Norte, possui uma plataforma continental larga (60 a 180 km) recoberta por sedimento lamoso e com influência da descarga do Rio Amazonas, indo do Amapá até o Golfo Maranhense. A extensão do litoral Nordeste vai das proximidades da baía de São Marcos (Maranhão) até a baía de Todos os Santos (Bahia), com um baixo aporte de sedimento terrígeno, devido à baixa drenagem hidrográfica, com plataforma continental estreita (13 – 60 km). Essa região compreende, portanto, todos os estados do nordeste brasileiro.

Por outro lado, a região Oriental ou Leste se estende de Salvador ao Cabo Frio, possuindo características parecidas com a costa Nordeste. Nessa região, há influência dos rios Jequitinhonha, Pardo, Contas e Caravelas na Bahia, rio Doce, no Espírito Santo, e Paraíba do Sul no Rio de Janeiro. São ambientes bastante diversificados quanto às nuances do relevo, sendo que no Sul da Bahia, destaca-se o banco de Abrolhos, costa baixa no Espírito Santo e dos contrafortes do Planalto Atlântico, iniciando-se em Vitória - ES (Cunha & Gerra, 2003).

Essa variedade peculiar da costa Leste do Brasil permite dividir essa região em cinco limites: Salvador a Ilhéus; Ilhéus ao rio Doce; rio Doce à Vitória; Vitória ao rio Itabapoana; rio Itabapoana a Cabo Frio. A plataforma de Abrolhos é considerada o limite entre as regiões Norte e Sul da costa Brasileira (Cunha & Guerra, 2003).

A largura da Plataforma continental Leste interna é variável: de 15 a 20 km entre Salvador e Ilhéus até 30 a 200 km entre Ilhéus ao Rio Doce. A região de Abrolhos e Bacia de Campos possuem um arco de curvatura Norte-Sul, variando de 27 a 40 km, tendo como limite a cordilheira da Vitória-Trindade até a foz do Itabapoana. A partir desse ponto até Cabo Frio, a plataforma se alarga, com valores médios em torno de 35 km (Cunha & Guerra, 2003).

A região Sudeste estende-se do Sul do Espírito Santo ao Cabo de Santa Marta em Santa Catarina, com largura da plataforma continental interna entre 4 a 65 km. Nesse trecho, as baías de Guanabara e Sepetiba (ambas no litoral do Rio de Janeiro) e os estuários de São Vicente em Santos e Barra de Cananéia (São Paulo) desempenham uma função importante no ciclo da vida marinha de espécies costeiras. A região Sul estende-se do cabo de Santa Marta até o Chuí com pouca variação no relevo em toda sua extensão e plataforma interna de largura variável, com 6 km no largo do cabo de Santa Marta (Santa Catarina) a 85 km na desembocadura da Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul (Cunha & Guerra, 2003).

Essas diferenças da geomorfologia da costa do Brasil também influenciam a diversidade de peixes estuarinos. A diversidade genética interpopulacional é usualmente maior na plataforma continental da região Nordeste devido ao isolamento das bacias hidrográficas e estuários nos períodos interglaciais. Porém, as populações do Sudeste tendem a manter maior coesão genética devido à conectividade das bacias hidrográficas onde a plataforma continental é mais larga, como resultado de maior fluxo gênico, tornado as populações mais homogêneas (Baggio *et al.*, 2017; Freitas *et al.*, 2017). Esse fenômeno é chamado de pulso de táxons, podendo gerar forte estruturação populacional e favorecer especiação em peixes tipicamente estuarinos em regiões de plataforma estreita, como proposto no peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Baggio *et al.*, 2017).

Outro fator que se admite exercer influência na diferenciação genética de populações e táxons da costa brasileira inclui as condições hidrológicas. As regiões Norte e Nordeste apresentam águas mais quentes (tropical) (MMA, 2010) devido à ação da corrente Sul-equatorial, que se subdivide na corrente Costeira do Norte do Brasil e do Brasil (Santos *et al.*, 2006). A região Sudeste e Sul caracteriza-se por águas mais frias (subtropicais), influenciadas pela corrente polar das Malvinas (Santos *et al.*, 2006) e ressurgência (MMA, 2010). Como esperado em função dessa heterogeneidade, há uma grande diversidade de ecossistemas acompanhada por diversificação de espécies com altos níveis de endemismo (Miloslavich *et al.*, 2011).

2.2 A família Sciaenidae

Por muito tempo, os peixes da ordem Perciformes, a qual inclui a maior parte dos teleósteos marinhos, foram tratados como um grupo polifilético (Nelson, 2015). Porém Betancur *et al.* (2013), utilizando dados moleculares, determinou o monofiletismo para a ordem ao incorporar os membros das ordens Scorpaeniformes, Gasterosteiformes e

Cottiformes. De acordo com essa nova classificação, a família Sciaenidae, anteriormente considerada um grupo de Perciformes, passa a ser um clado à parte da ordem, dentro de uma classificação mais ampla, denominada de supraordem Percomorpharia que inclui os Perciformes e 151 famílias, predominantemente marinhas (Fig. 2).

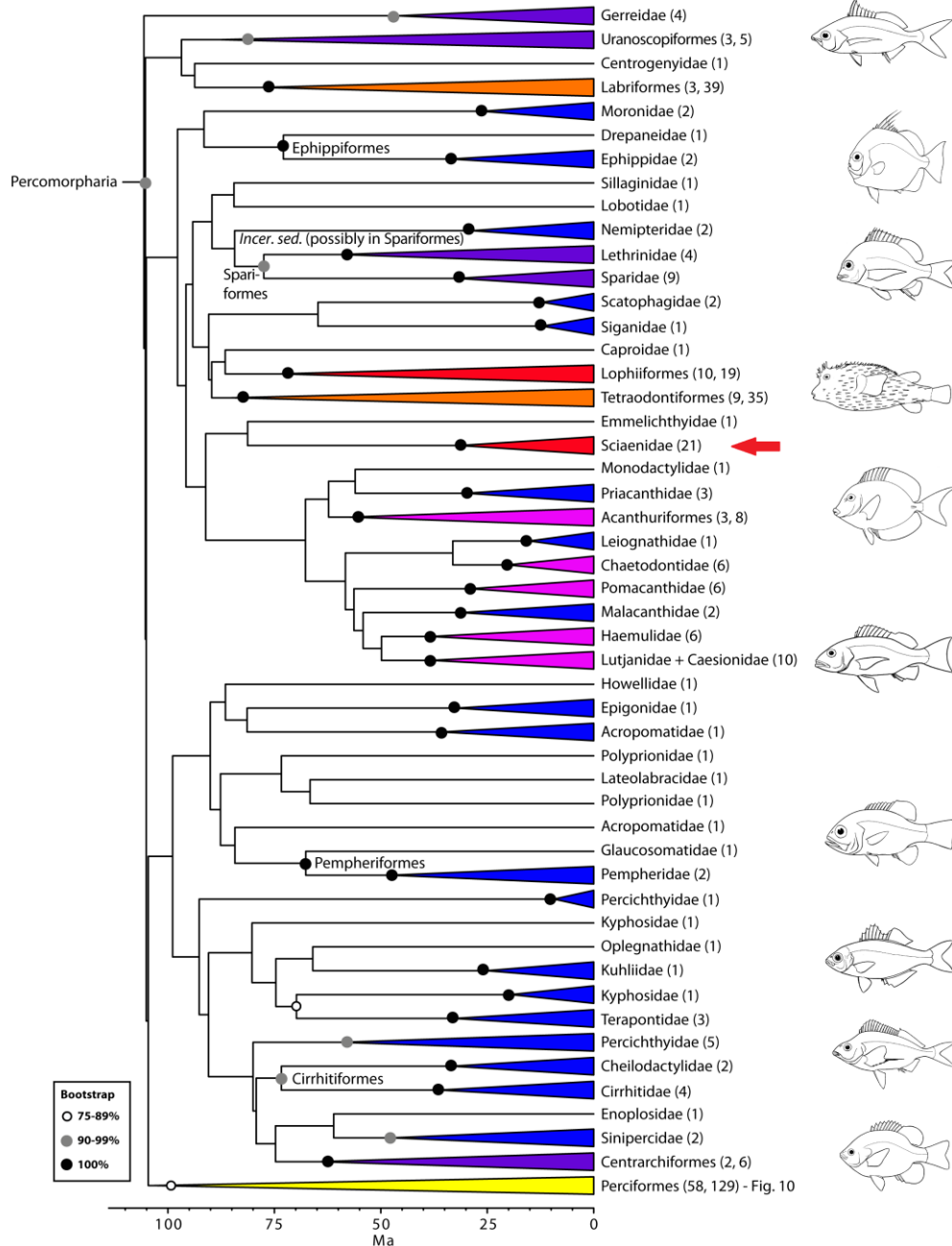
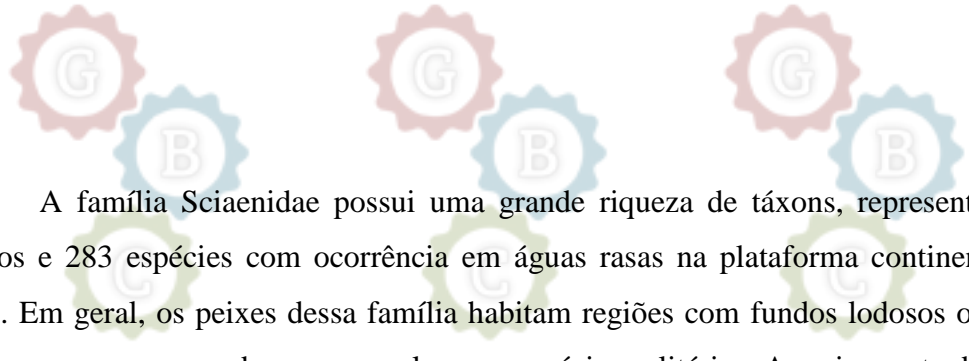


Figura 2. Relação filogenética da supraordem Percomorpharia (Betancur *et al.*, 2013). A seta indica a família Scianidae.



A família Sciaenidae possui uma grande riqueza de táxons, representados por 67 gêneros e 283 espécies com ocorrência em águas rasas na plataforma continental (Nelson, 2015). Em geral, os peixes dessa família habitam regiões com fundos lodosos ou arenosos e vivem em pequenos cardumes, com algumas espécies solitárias. A maior parte das espécies é marinha e estuarina, com 28 espécies restritas à água doce (Nelson, 2015).

O centro de origem e dispersão da família Sciaenidae ainda não está claro, porém existem três hipóteses baseadas em dados fósseis. A primeira é proposta por Chu *et al.* (1963) na qual o Oceano Índico seria o centro de origem a partir do Terciário ou Quaternário. A segunda propõe o mar de Tétis como centro de origem, entre a Laurasia e Gondwana, no Jurássico tardio, com dispersão de uma linhagem para o Oeste pré-Atlântico e a outra para o leste pré-Índico e Pacífico (Chao, 1986). A terceira hipótese, proposta por Sasaki (1989), cita que a família teria origem na América tropical, com posterior dispersão para o leste e oeste do Indo-Pacífico.

Recentemente, estudos com dados mitogenômicos (Xu *et al.*, 2014) remontam a origem dos Sciaenidae por volta do Jurássico tardio e início do Cretáceo, há 208 milhões de anos atrás, compatível com o proposto por Chao (1986). Porém, o centro de origem não é concordante, uma vez que Xu *et al.* (2014) apontam a América tropical como o principal centro de origem para a família.

Análises genéticas também foram úteis para reconstruir as relações filogenéticas de Sciaenidae do Atlântico Sul ocidental, conforme trabalho realizado por Santos *et al.* (2013), utilizando dois marcadores mitocondriais e um marcador nuclear de 45 espécies e 19 gêneros dessa família, (Fig. 3). Os dados moleculares revelaram três clados, sendo o primeiro formado por *Macrodon*, *Cynoscion* e *Isopisthus*; o segundo por *Lonchurus* e *Paralonchurus*; e o último por *Bairdiella*, *Stellifer* e *Ophioscion*. *Plagioscion* e *Pachurus* (grupos dulcícolas) não foram agrupados em um mesmo clado, indicando que a conquista ao ambiente de água doce ocorreu em eventos independentes. *Cynoscion* também não formou um grupo monofilético devido ao maior relacionamento evolutivo de espécies desse gênero com *Isopisthus*, levando à sugestão da realocação desse último no gênero *Cynoscion*.

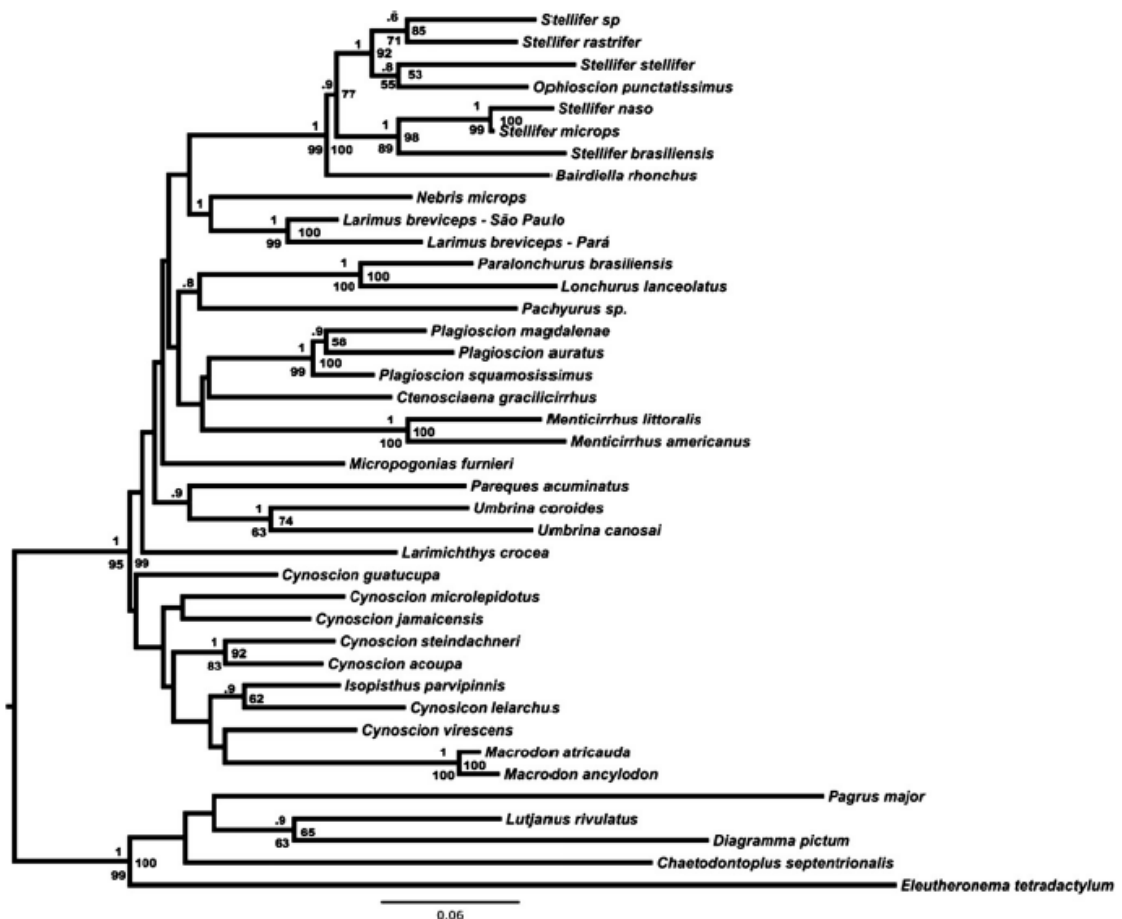


Figura 3. Filogenia dos Sciaenidae do Atlântico Sul ocidental proposta por Santos *et al.* (2013).

2.3 O gênero *Macrodon* no Atlântico Sul

O gênero *Macrodon* atualmente é representado por duas espécies que ocorrem ao longo da costa oriental e uma espécie na costa ocidental da América do Sul, denominadas *M. atricauda* e *M. ancylodon* (Oceano Atlântico Sul ocidental) e *M. mordax* (Oceano Pacífico Oriental) (Carvalho-Filho *et al.*, 2010).

Porém, devido às características morfológicas similares, as espécies de *Macrodon* do Atlântico Sul, foram consideradas um único táxon amplamente distribuído ao longo da costa brasileira por muitas décadas. De fato, as principais diferenças anatômicas encontradas entre as espécies incluem o canino mandibular superior maior, maior número de raios na nadadeira dorsal e até 66 escamas na linha lateral em *M. ancylodon* enquanto *M. atricauda* apresenta mais raios na nadadeira anal e até 63 escamas na linha lateral (Carvalho-filho *et al.*, 2010).

Porém, tal distinção morfológica só foi detalhada após análises filogenéticas e populacionais, utilizando marcadores mitocondriais (16S e CYT-B) em indivíduos de *Macrodon* da Venezuela e de oito estados brasileiros (Amapá, Pará, Maranhão, Pernambuco, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Santos *et al.* 2003). Com base nos

dados de divergência nucleotídica, os autores determinaram a existência de dois clados: Tropical (Venezuela, Amapá, Pará, Maranhão e Pernambuco) e Subtropical (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Esses resultados foram corroborados pelas análises de ML e NJ com valores de *bootstrap* superiores a 93%.

Posteriormente, uma análise de estruturação genética utilizando o marcador mitocondrial CYT-B não encontrou evidências de fluxo gênico entre os clados Tropical e Subtropical (Santos *et al.*, 2006). De acordo com os autores, a temperatura da água seria a principal responsável pela formação dos grupos, visto que o clado Tropical seria restrito a regiões mais quentes, influenciadas pela corrente equatorial, norte do Brasil e a do Brasil, enquanto o Subtropical seria restrito a águas mais frias, influenciadas pela corrente das Malvinas. Diante dessa clara distinção genética entre os clados, foi realizada a revisão morfológica supracitada a qual revalidou a espécie de *Macrodon atricauda* para a clado subtropical (com distribuição do Espírito Santo até a Argentina), mantendo a nomenclatura *M. ancylodon* como válida apenas para o clado Tropical (Fig. 4) (Carvalho-Filho *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos avaliaram a estrutura dos otólitos de ambas as espécies, relatando uma clara separação entre norte e sul do Brasil (Cardoso *et al.*, 2012).



Figura 4. Distribuição de *Macrodon ancylodon* (amarelo) e *Macrodon atricauda* (verde) (Carvalho-Filho *et al.*, 2010).

Análises populacionais subsequentes à revalidação do clado subtropical, utilizando o marcador mitocondrial D-loop, demonstraram a subdivisão deste em dois grupos. Apesar da moderada diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica encontrada, estas populações encontram-se em recente expansão demográfica com os haplótipos mais frequentes na Argentina e Rio Grande do Sul, sugerindo expansão de *Macrodon atricauda* para o Norte (Rodrigues *et al.*, 2013).

2.4 Barreiras geográficas, especiação e hibridação

Em geral, as barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies podem ser pré-zigóticas quando não é possível gerar fecundação cruzada, seja por incompatibilidades ecológicas, reprodutivas, gaméticas, morfológicas ou genéticas, ou pós-zigóticas, quando ocorre a formação de zigotos inviáveis ou híbridos com viabilidade reduzida (Ridley, 2008). No ambiente marinho, as barreiras de isolamento pré-zigótico podem envolver transições ambientais (salinidade e temperatura da água) ou por zonas de afloramento oceânico (e.g. áreas de ressurgência), como observado em peixes do Atlântico Sul (Santos *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017) e África Ocidental (Henriques *et al.*, 2014).

Barreiras geográficas atuais ou pretéritas também podem proporcionar isolamento pré-zigótico em ambientes marinhos, como demonstrado em *Cathorops mapale* (do Sudeste da Colômbia Caribenha) e *Cathorops* sp. (Colômbia até a Venezuela). Nesse caso, as duas espécies estão separadas pelo Parque Nacional Natural de Tayrona (PNNT) (Betancur *et al.*, 2010). A hipótese levantada é que a progressão da montanha Santa Marta Massif localizada no PNNT, possibilitou a formação de recifes de corais, limitando o fluxo gênico entre ambas as formas, tipicamente estuarinas, levando à especiação.

Outro fator que impossibilita o cruzamento entre espécies simpátricas intimamente relacionadas de peixes marinhos e dulcícolas é o padrão de coloração e o seu papel nas escolhas dos parceiros, como ocorre entre *Etheostoma barrenense* e *Etheostoma zonale* (Percidae) (Williams & Mendelson, 2011) e nos ciclídeos africanos *Pundamilia nyererei* e *Pundamilia pundamilia* (Ridley, 2008). Em ambos os casos, as fêmeas exibem padrão coespecífico na seleção de machos em função da coloração e padrão nupcial de faixas dos machos, constituindo um isolamento reprodutivo comportamental.

Questões hormonais que influenciam no comportamento social em peixes também são exemplos de barreiras de isolamento em espécies relacionadas. Em dois cladogramas irmãos de

ciclídeos africanos, *Mbipia lutea* e *Mbipia mbipi* com distribuição simpátrica no Lago Vitória, o padrão de coloração dos machos e o perfil de agressividade mostraram ter relação com a regulação do hormônio glicocorticóide, determinando variação de agressividade e diversificação ecológica nas áreas de forrageamento entre espécies congêneras (Dijkstra *et al.*, 2012), assumindo nichos distintos.

No caso de ambientes marinhos, outros fatores como a distância (Domingues, *et al.* 2007), frentes polares e calhas em ambientes profundos impossibilitam a dispersão de larvas e adultos, podendo favorecer a especiação (Shaw *et al.*, 2004). Adicionalmente, a incompatibilidade entre gametas de indivíduos com fertilização externa pode levar ao isolamento reprodutivo (Ridley, 2008). De fato, revisões recentes mostram evolução adaptativa de proteínas de reconhecimento de gametas (GRPs) nesses grupos, cujas incompatibilidades entre espécies podem ter surgido como reforço ao isolamento reprodutivo (Kosman & Levitan, 2014).

No caso das espécies de peixes ósseos e cartilagosos do Atlântico Sul Ocidental, as principais barreiras favoráveis à especiação seriam a variação na temperatura e salinidade (Santos *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017), profundidade da costa (Costa *et al.*, 2017), flutuações do nível do mar associadas a diferenças na largura da plataforma continental (Baggio *et al.*, 2017) e as descargas de água doce e sedimentos dos Rio Amazonas e Orinoco (Luiz Jr. *et al.*, 2011).

O surgimento dessas barreiras de isolamento pode proporcionar a diferenciação alopatrica entre as populações e evolução independente até que a divergência das populações seja suficiente para promover a especiação (Ridley, 2008). Porém, espécies filogeneticamente relacionadas ainda que separadas por barreiras que impossibilitam o fluxo gênico podem restabelecer zonas de contato e ocorrer intercruzamento. Nesse caso, essa barreira não constitui isolamento reprodutivo total seja em função do curto tempo de divergência e/ou por modificações nos padrões espaciais de distribuição, gerando descendentes entre espécies supostamente distintas após contato secundário em locais específicos, denominados zonas de hibridação (Futuyma, 2003; Ridley, 2008; Abbott *et al.*, 2013).

O termo hibridação é utilizado para caracterizar cruzamento entre espécies, porém esse conceito é arbitrário, pois não há um conceito definitivo para espécie (Allendorf & Luikart, 2007). Assim, parece ser mais apropriado designar o termo quando ocorre o cruzamento entre espécimes geneticamente distintos (indivíduos de populações distintas ou

grupos de populações evolutivamente diferenciados) produzindo indivíduos mistos (Harrinson, 1990)

Segundo essa premissa, a hibridação em ambiente natural pode ocorrer entre indivíduos de mesma espécie (hibridação intraespecífica), mantendo as populações unidas por fluxo gênico, não sendo potencialmente prejudiciais às populações, pois os alelos e os genótipos de adaptação local serão mantidos (Allendorf & Luikart, 2007). Nesses casos, costuma-se visualizar um padrão reticulado de haplótipos entre as populações estruturadas, como verificadas para o peixe estuarino *Atherinella brasiliensis*, do Atlântico Sul Ocidental (Baggio *et al.*, 2017). Quando a hibridação ocorre entre espécies claramente reconhecidas (hibridação interespecífica) ela pode representar uma importante fonte para variabilidade genética, assim como, proporcionar a perda de *fitness* e extinção local de espécies nativas (Allendorf & Luikart, 2007).

A ocorrência da hibridação com certa frequência entre espécies relacionadas pode gerar variedade adaptativa mais rapidamente que a mutação (mutações são raras e podem demandar muito tempo para conferir vantagem adaptativa). Nesses casos, espera-se que haja introgressão de alelos de uma população, gerando novas combinações alélicas e possíveis eventos de especiação por evolução adaptativa (Abbott *et al.*, 2013). Para que a introgressão ocorra, os híbridos devem ser viáveis e capazes de realizar retrocruzamento com os parentais. Esse processo pode conferir radiação adaptativa seja por falta de competição em ambientes subutilizados e explorados pelas formas introgrididas ou pela ocorrência de novidades evolutivas (novos genótipos) com vantagem adaptativa superior às formas parentais. Tal fenômeno, denominado de segregação transgressiva, pode explicar as elevadas taxas de cruzamento e radiação adaptativa após eventos de hibridação (Seehausen, 2004).

Ainda, as novas combinações de alelos na zona de contato com formação de híbridos viáveis podem gerar traços que conferem o reforço do isolamento pré-zigótico, garantindo que combinações genéticas vantajosas não sejam perdidas por hibridação sucessiva com formas parentais. A manutenção desse reforço vai depender do fluxo gênico entre as populações fontes de hibridação e da zona de contato, assim como das pressões seletivas que estão atuando para uma melhor adaptação (Abbott *et al.*, 2013). Caso o fluxo seja limitado, o reforço pode ser gerado pela evolução dos traços reprodutivos dentro da sobreposição, podendo levar ao isolamento reprodutivo das populações em simpatria. Quando as populações fontes de hibridação possuem diferentes sítios de sobreposição, o contato entre populações distintas pode gerar combinações alélicas únicas para cada sítio (Abbott *et al.*, 2013).

Porém, a hibridação introgressiva também tem suas desvantagens, como pode ser visto nas espécies do gênero *Acanthopagrus* (Teleostei, Sparidae) nos estuários do Leste da Austrália. A espécie *Acanthopagrus butcheri* completa todo seu ciclo de vida nos estuários e pode ocorrer em simpatria com *Acanthopagrus australis*, uma espécie marinha que utiliza os estuários para berçários e local de alimentação para os juvenis. Ambas podem formar híbridos, e os indivíduos retrocruzados competem reprodutivamente com as fêmeas de *A. butcheri*, levando à extinção local de determinadas populações (Roberts *et al.*, 2009).

Independentemente das desvantagens ou vantagens adaptativas do cruzamento entre espécies, a zona de hibridação pode ser mantida por longos períodos. No primeiro caso, costuma haver uma zona de tensão, quando os híbridos são mantidos pelo equilíbrio entre seleção contra híbridos e migração. Por outro lado, as zonas híbridas podem ser asseguradas pela superioridade híbrida, quando existe um gradiente ambiental entre as espécies e os híbridos, sendo estes últimos mais adaptados ao ambiente intermediário. Por fim, há situações descritas como mosaico, nas quais os híbridos são mais adaptados em ambientes parcialmente ocupados pelas formas parentais, não existindo gradiente de variação clinal (Arnold, 1997).

Desse modo, vários exemplos de zonas híbridas são relatados em ambiente natural. Por exemplo, nas espécies de anfíbios *Litoria ewingii* e *Litoria paraewingii* do nordeste da Austrália, é possível encontrar indivíduos híbridos e retrocruzados nos seus limites de distribuição, perfazendo uma zona estreita de hibridação (Smith *et al.*, 2013). Essa zona de hibridação foi caracterizada como uma zona de tensão, pois a zona de contato mostrou-se um cline estreito com baixa abundância de híbridos. Análises com o DNA mitocondrial e nuclear mostraram clines coincidentes, o que é muito comum em zonas de tensão. Isso mostra que a zona de hibridação é mantida pela dispersão das espécies para esses centros e que a seleção atua contra essa zona de hibridação (Smith *et al.*, 2013).

Contudo, há uma dificuldade de identificar se as zonas de hibridação são geradas por contato secundário (modelo usualmente inferido) ou por introgressão primária, onde o fluxo gênico ocorre desde o início de eventos de divergência (Allendorf & Luikart, 2007). Um exemplo de introgressão primária ocorre com as plantas do gênero *Senecio* do Monte Etna na Sicília. As espécies *Senecio aethnensis* (adaptada a altas altitudes) e *S. chrysanthemifolius* (típica de baixa altitude) estão em contato em altitude intermediárias, formando uma zona de hibridação. As análises com SNPs mostraram que o fluxo gênico ocorre desde o processo de especiação, diminuindo com o decorrer da divergência devido à adaptação local, constituindo um exemplo de divergência ecológica com fluxo gênico entre espécies (Filatov *et al.*, 2016).

Outros casos de hibridação podem ocorrer por ação antropogênica devido à modificação do habitat, introdução de espécies exóticas ou alóctones, escape de híbridos de piscicultura e pelas mudanças climáticas (Allendorf & Luikart, 2007). Espécies simpátricas de peixes do gênero *Coregonus* (Salmonidae) em lagos pré-Alpinos da Europa, diversificaram por radiação adaptativa e estavam isoladas por mecanismos pré-zigóticos devido a diferenças de habitat e épocas de desova (isolamento ecológico e comportamental). Contudo, modificações antrópicas nas características dos lagos levaram à homogeneização dos ambientes, proporcionando o contato secundário entre espécies próximas e o fluxo gênico entre elas, diminuindo a diversidade genética devido à hibridação reversa (Vonlanthen *et al.*, 2012). Nesse mesmo grupo de peixes, a introdução pelo homem de *Coregonus albula* no lago Rahajarvi, na Lapónia Finlandesa, proporcionou a hibridação com a espécie nativa *Coregonus lavaretus*, assim como a introgressão com as formas parentais. Os híbridos e as formas introgridas mostraram morfologia intermediária entre as espécies parentais, porém não perderam a capacidade da utilização do mesmo nicho, sem evidência da seleção contra esses híbridos (Kahilainen *et al.*, 2011).

Similarmente, a introdução da truta *Oncorhynchus mykiss* no Rio Flathead, oeste da América do Norte, nos anos 70 proporcionou a formação de híbridos com a espécie nativa *Oncorhynchus clarkii lewisi* em locais restritos da bacia e em pequena proporção. Em 30 anos de monitoramento, observou-se que o aumento da temperatura e as diminuições nas taxas de precipitação por mudanças climáticas beneficiaram a expansão da truta invasora e de populações híbridas, resultando em maior taxa de introgressão (Muhlfeld *et al.*, 2014).

No caso do Brasil, destaca-se o cruzamento entre bagres de água doce da família Pimelodidae, *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), promovido em pisciculturas de diversos estados brasileiros por questões zootécnicas, gerando híbridos férteis. Porém, *P. corruscans* é uma espécie nativa do Alto Paraná, a qual tem sofrido decréscimo populacional por construção de barragens, sobrepesca e perda de habitat, podendo ser potencialmente afetada pela hibridação introgressiva. De fato, híbridos já foram encontrados em ambientes naturais ao longo do Alto Paraná. Porém, dados moleculares em larvas e adultos apontam que esses indivíduos devem ser provenientes de escapes eventuais de estações de pisciculturas, sugerindo que não ocorre hibridação na natureza (Baggio *et al.*, 2016). Aparentemente, esse seria um caso de depressão exclusiva, onde os híbridos seriam eliminados por seleção natural (Smith *et al.*, 2013).

Deve-se destacar também que os padrões de aptidão ao se comparar formas híbridas ou introgridas com as espécies parentais podem variar ao longo das gerações, de modo que híbridos de primeira geração podem ter vantagem igual ou superior aos parentais, mas serem excluídos na segunda geração ou gerações posteriores (Kahilainen *et al.*, 2011; Allendorf & Luikart, 2007; Abbott *et al.*, 2013).

Esses exemplos demonstram a complexidade da evolução do isolamento reprodutivo e do dinamismo do processo de especiação e hibridação. Contudo, esse enfoque tem sido negligenciado em peixes estuarinos da costa brasileira, ainda que bem documentado em espécies recifais (Yaakub *et al.*, 2006; Montanari *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

Analisar geneticamente populações de *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* ao longo da costa dos estados da Bahia e Espírito Santo por meio de marcadores moleculares, visando testar a hipótese de existência de zona de contato e/ou mistura de haplótipos, assim como determinar os fatores biogeográficos que influenciaram os padrões de distribuição atual.

3.1 Objetivos Específicos:

- Utilizar marcadores moleculares mitocondriais (citocromo oxidase subunidade I – COI, citocromo *b* – CYT-B e rRNA 16S) e nucleares (tolueno-4-monooxigenase – Tmo-4C4, Rodopsina – RHO) para definir a identidade genética e diversidade haplotípica das espécies de *Macrodon* do Atlântico Sul ocidental ao longo dos limites de distribuição e provável zonas de contato de *M. atricauda* e *M. ancylodon*;
- Verificar, quantificar e caracterizar a existência de eventos de hibridação e introgressão, assim como caracterizar localmente a zona de contato entre as espécies, caso presente.
- Avaliar a partição da diversidade genética ao longo da distribuição geográfica de cada espécie, determinando o ponto de separação de ambas na costa brasileira, inferindo os fatores biogeográficos e oceanográficos para a especiação no gênero no Atlântico Sul Ocidental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem e extração de DNA

Um total de 124 espécimes de *M. ancylodon* e de 53 exemplares de *M. atricauda* (Fig. 5) foi obtido ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Fig. 6; Tabela 1) a partir de pesca de arrasto de fundo. A coleta foi autorizada pelo Ministério do Meio-Ambiente, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) com licença SISBIO (sistema de autorização e informação em biodiversidade) sob o número 50628. Os procedimentos de eutanásia e extração de tecidos e de DNA foram previamente autorizados pelo Comitê de Ética No Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA/UESB no. 71/2014).



Figura 5. Fotografia dos exemplares de *Macrodon ancylodon* (A) e *Macrodon atricauda* (B).

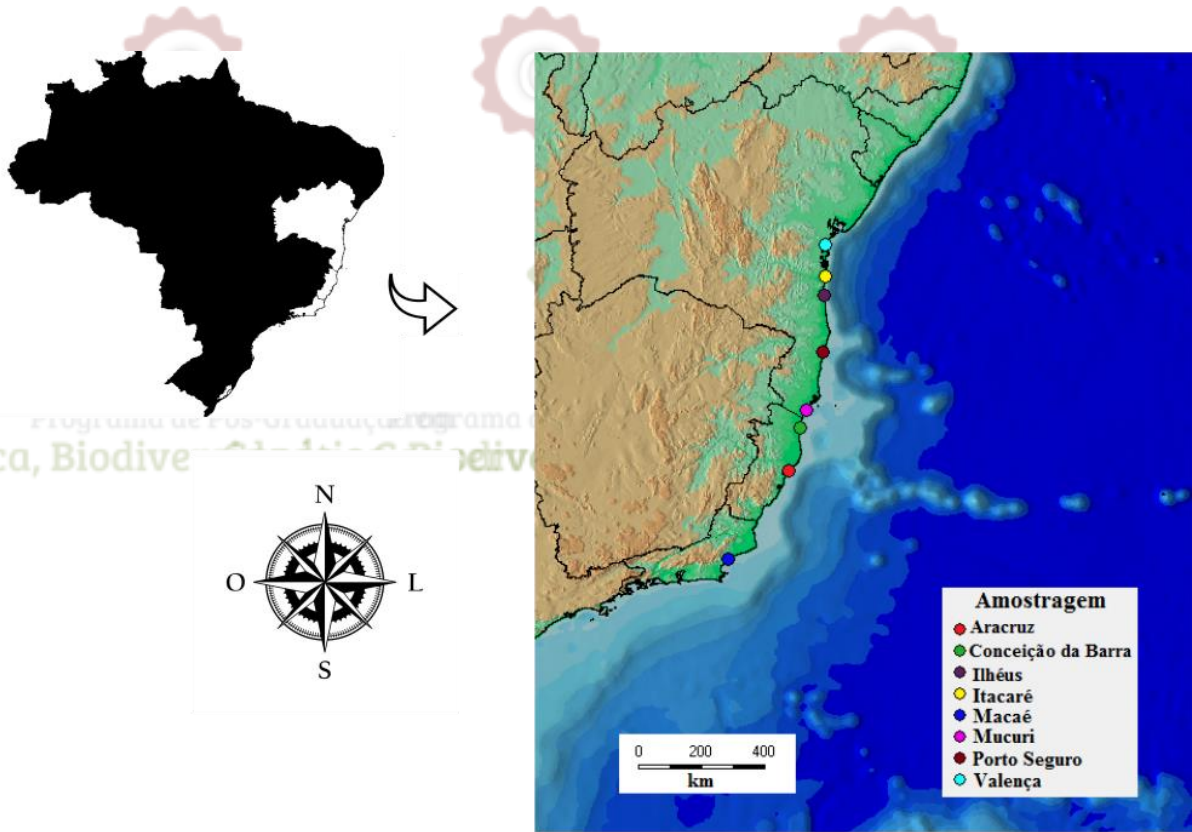


Figura 6. Pontos de coleta das espécies inicialmente identificadas como *Macrodon ancylodon* na Bahia (Valença, Itacaré, Ilhéus e Mucuri) e *Macrodon atricauda* no Espírito Santo (Aracruz e Conceição da Barra) e no Rio de Janeiro (Macaé).

Tabela 1. Descrição das localidades e amostragem (N) de espécies de *Macrodon* no litoral nordeste e sudeste do Brasil.

Provincia	Estado	Município	Estuário	Coordenadas		N
Tropical	Bahia	Valença	Rio Una	-13,3784	-38,9768	28
		Itacaré	Rio de Contas	-14,272099	-38,989695	3
		Ilhéus	Rio Cachoeira	-14,801671	-39,025454	24
		Porto Seguro	Rio Buranhém	-16,453291	-39,067048	29
		Mucuri	Rio Mucuri	-18,094519	-39,547752	40
Subtropical	Espírito Santo	Conceição da Barra	Rio São Mateus	-18,605333	-39,72956	23
		Aracruz	Rio Riacho	-19,83102	-40,057764	14
		Rio de Janeiro	Macaé	Rio Macaé	-22,372588	-41,7731

As amostras de tecido muscular foram retiradas após fotografia de todos os espécimes, acondicionadas em álcool absoluto e estocadas em freezer a -20°C até a extração de DNA. Alguns espécimes foram devidamente fixados em formol 10% por 48h e posteriormente depositados na coleção ictiológica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

As amostras de DNA genômico foram obtidas utilizando o kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com instruções do fabricante com ligeiras modificações (uso de metade do volume de todos os reagentes do kit, álcool isopropanol e etanol a -20°C). Em seguida, as amostras foram coradas com GelRed (Biotium) e avaliadas

qualitativa e quantitativamente por eletroforese em gel de agarose 1%, com uma corrida de 40 minutos a uma voltagem 100V.

4.2 Condições de PCR

Foram escolhidos três marcadores moleculares mitocondriais: DNAr 16S (16S), Citocromo b (CYT-B), e Citocromo oxidase C sub unidade 1 (COI). Os marcadores nucleares eleitos para as análises foram os genes da Rodopsina (RHO) e da tolueno-4-monooxigenase (TMO-4C4). As reações perfizeram um volume final de 15 µl para todos os marcadores, cujo volume e a concentração dos reagentes utilizados são mostrados na tabela 2, enquanto os *primers* utilizados e as condições de PCR são mostrados na tabela 3.

Tabela 2. Condições de PCR para cada marcador molecular utilizado.

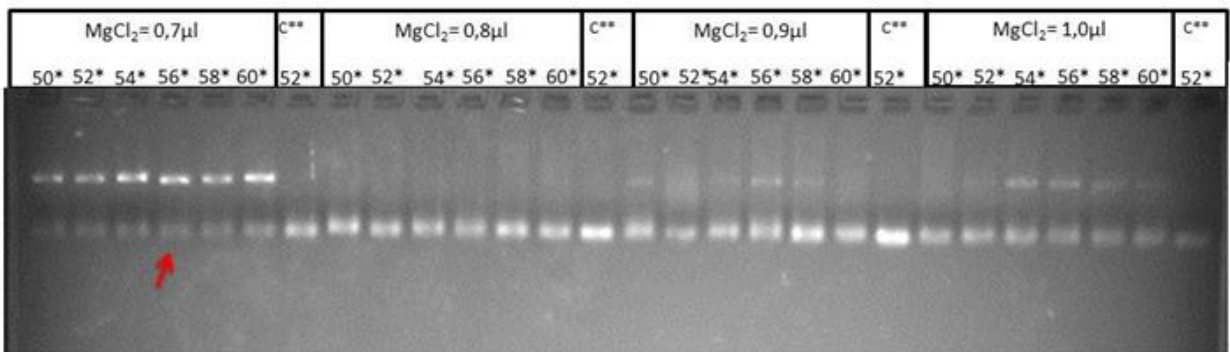
Reag.	RNAr 16S		CYT-B		COI		RHO		TMO-4C4		
	CI	V(µl)	CF	V(µl)	CF	V(µl)	CF	V(µl)	CF	V(µl)	CF
H ₂ O	--	7,94-4,94	--	7,84-4,84	--	7,84-4,84	--	7,94-4,94	-	7,94-4,94	-
dNTP	1,0 mM	3	0,2 mM	3	0,2 mM	3	0,2 mM	3	0,2 mM	3	0,2 mM
Tampão	10X	1,5	1X	1,5	1X	1,5	1X	1,5	1X	1,5	1X
MgCl ₂	50 mM	0,6	2 mM	0,7	3,0 mM	0,7	3,0 mM	0,6	2 mM	0,6	2 mM
PF	10 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM
PR	10 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM	0,42	0,28 mM
Taq	5 U/µl	0,12	0,04 U/µl	0,12	0,04 U/µL	0,12	0,04 U/µl	0,12	0,04 U/µl	0,12	0,04 U/µl
DNA	>50ng	1,0-4,0	-	1,0-4,0	-	1,0-4,0	-	1,0-4,0	-	1,0-4,0	-
VF		15,0		15,0		15,0		15,0		15,0	

CI= Concentração inicial, CF= Concentração final, V= Volume, Reag. = reagentes, PF = *Primer F*, PR, *primer R* e VF = Volume final.

Tabela 3. Condições de PCR para os marcadores moleculares mitocondriais (RNAr 16S, CYT-B e COI) e nucleares (ROD e TMO-4C4) para as espécies de *M. ancylodon* e *M. atricauda*.

Gene	Primer	Condições de amplificação
16S	16 S1L: 5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3' 16 S2H: 5' TTTCCCCGCGGTCGCCCC 3' (Palumbi, 1996)	3 min (desnaturação) a 94°C. 30 ciclos: 1min (desnaturação) a 94°C, 1min (anelamento) a 48°C e 1 min 30s (extensão) a 72°C. 10 min (extensão) a 72°C.
CYT-B	TrucCyt-BR 5' -CCGACTTCCGGATTACAAGACCG - 3' FishCyt-BF- 5'-ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGA- 3' (Sevilla <i>et al.</i> , 2007).	3 min (desnaturação) a 94°. 35 ciclos: 1min (desnaturação) a 94°C, 45s (anelamento) a 52°C e 1 min 30s (extensão) a 72°C. 10 min (extensão) a 72°C.
COI	VF2_t1 - 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' VRI_t1 - 5'CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGTTCTAATAATCA- 3'. (Ivanova <i>et al.</i> , 2007).	4 min (desnaturação) a 95°C. 5 ciclos: 40 s (desnaturação) a 95°C, 40s (anelamento) a 48°C, 1 min 30s (extensão) a 72°C. 35 ciclos: 40 s (desnaturação) a 95°C, 40s (anelamento) a 56°C e 1 min 30s (extensão) a 72°C. 10 min (extensão) a 72°C.
RHO	Rod-F2w 5' - AGCAACTTCCGCTTC GGTGAGAA - 3' Rod-R4n 5'-GGAAGTCTTGTTTCATGCAGATGTAGAT- 3' (Sevilla <i>et al.</i> , 2007).	7 min (desnaturação) a 95°C. 35 ciclos: 30s (desnaturação) a 95°C, 30s (anelamento) a 59°C e 30s (extensão) a 72°C. 7 min (extensão) a 72°.
TMO-4C4	F2: 5' CGGCCTTCCTAAAACCTCTCATTAAAG 3' R2: 5' GTGCTCCTGGGTGACAAAGTCTACAG 3' (Streelman & Karl, 1997)	2 min (desnaturação) a 95°C. 35 ciclos: 30s (desnaturação) a 95°C, 30s (anelamento) a 60°C e 1min (extensão) a 72°C. 7 min (extensão) a 72°.

Para o marcador COI, foram realizados testes de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) a fim de determinar a temperatura de anelamento mais adequada, assim como as concentrações do MgCl₂, co-fator indispensável para o funcionamento da enzima DNA polimerase. No primeiro caso, foi feito um gradiente de temperatura de anelamento, variando de 50 a 60°C, com intervalos de dois graus. No segundo caso, as concentrações do MgCl₂ variaram de 2,3 a 3,3 mM, correspondendo aos volumes de 0,7 a 1,0 µl obtidos a partir de uma solução estoque a 50 mM (concentração inicial). O teste mostrou-se eficiente para todas as populações (ver condição de PCR e programa nas tabelas 2 e 3, respectivamente). Porém, as melhores amplificações foram obtidas com concentração de 3 mM de MgCl₂ independentemente da temperatura de anelamento (Fig. 7 e 8A). Para a repetição nos demais indivíduos, foi escolhida a temperatura de 56°C com 3 mM de MgCl₂.



*Temperatura em °C/**Controle

Figura 7. Perfil eletroforético dos gradientes de temperatura e concentração de MgCl₂ (0,7 µl = 2,3 mM; 0,8 µl = 2,6 mM; 0,9 µl = 3 mM; 1,0 µl = 3,3 mM) na amplificação do COI. A seta vermelha mostra as temperaturas e a concentração de MgCl₂ escolhidas para a amplificação.

Os marcadores CYT-B e 16S e foram amplificados conforme as condições descritas por Santos *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2003), respectivamente, porém sob temperatura de anelamento maior, igual a 52°C (Tabelas 2 e 3). Ambos os marcadores foram eficientes no teste de amplificação de DNA de *M. ancylodon* e *M. atricauda* (Fig. 8B, 8C). Para o marcador nuclear RHO, foram respeitadas as condições de PCR (Tabelas 2 e 3) descritas por Barbosa *et al.* (2014) (Fig. 8D), com amplificação bem sucedida para ambas as espécies.

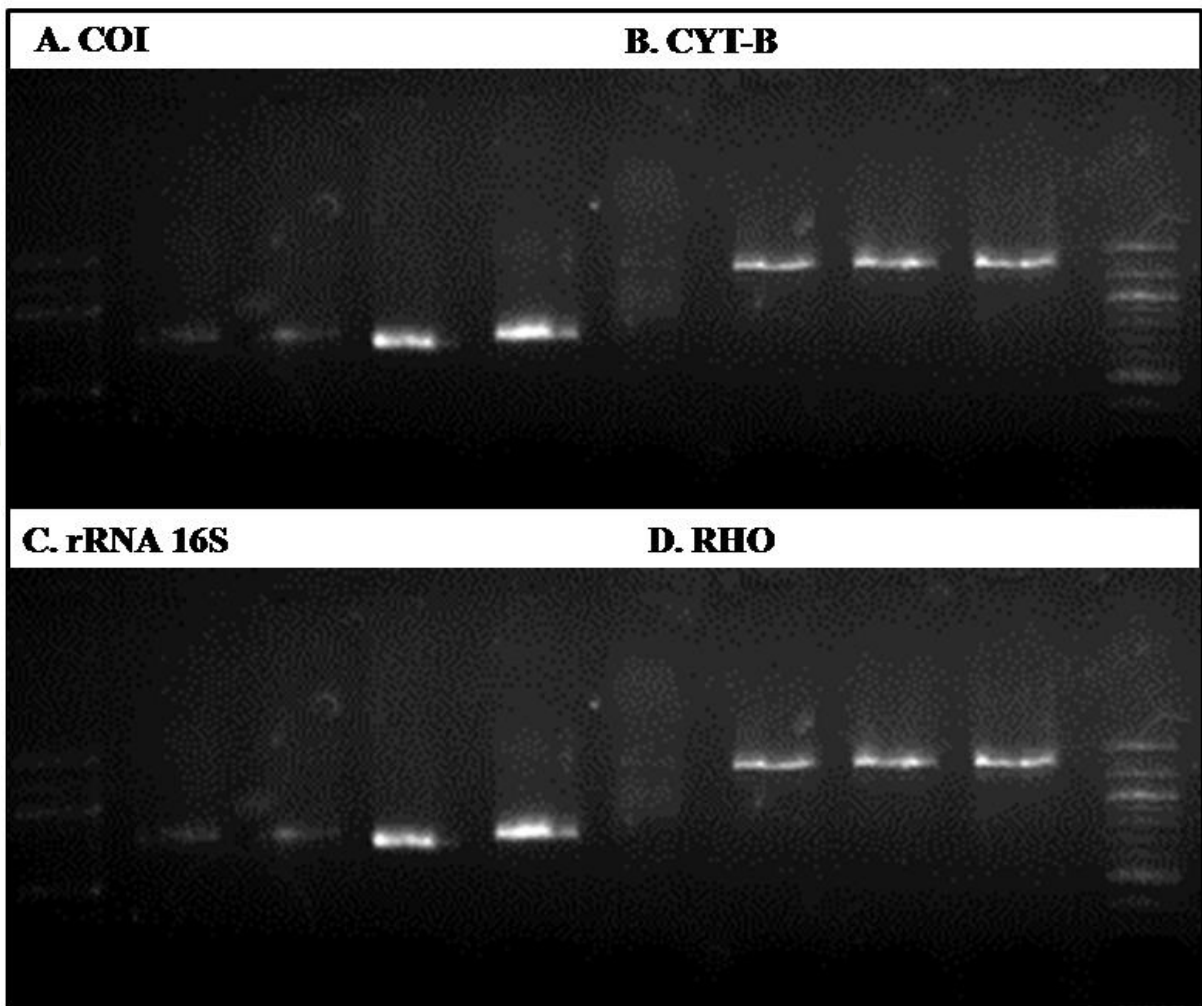


Figura 8. Perfil eletroforético para o gene de COI (A), CYT-B (B), RNAr 16S (C) e RHO (D). Foram selecionados quatro indivíduos das amostras de amplificação por gene, onde os dois primeiros poços representam amostras de *M. ancylodon* e os dois últimos são amostras de *M. atricauda*.

O marcador nuclear TMO-4C4 foi amplificado respeitando as condições de PCR (Tabelas 2 e 3) descritas por Santos *et al.* (2013) (Fig. 9), com amplificação bem sucedida em todos os pontos coletados.

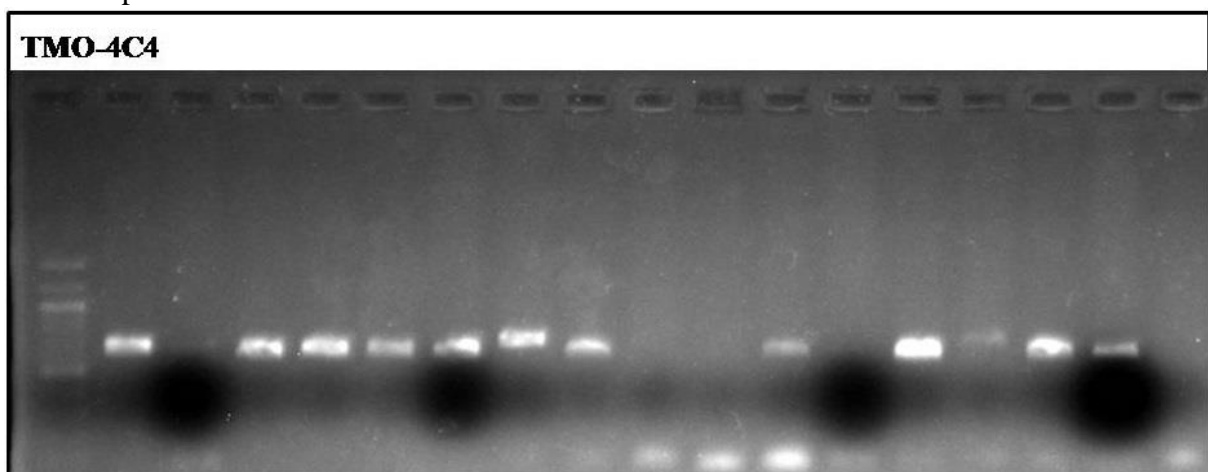


Figura 9. Perfil eletroforético para o gene de TMO-4C4. Os oito primeiros poços a partir da esquerda incluem amostras de *M. ancylodon* enquanto os demais representam *M. atricauda*.

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento utilizando-se o método didesoxiterminal (Sanger *et al.*, 1977), com reagentes do kit *BigDye Terminador v. 3.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies)*, de acordo com as orientações do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems/Life Technologies*).

4.3 Edição e verificação de sequência

Os eletroferogramas das regiões genômicas mitocondriais e nucleares foram editadas e sequências consenso foram alinhado no Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) incluído no BioEdit v. 7.2.6.1 (Hall, 1999). Para o gene 16S, apenas sequências *forward* foram analisadas, pois a amostras do fragmento reverso não foram sequenciadas, e editadas a partir da análise detalhada do cromatograma. Picos duplos encontrados nos eletroferogramas nucleares foram codificados respeitando o código de nucleotídeo ambíguo da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Todas as sequências consenso (e *forward* do 16S) foram verificadas no NCBI (*National Center for Biotechnology information*) com a função *BLAST*, para obtermos certeza da região amplificada e identificação dos espécimes.

4.4. Análise de distância e árvore de *Neighbor-Joining*

A análise de distância par-a-par entre os grupos e a árvore de *Neighbor-Joining* foram geradas no MEGA v. 7.0.26-1 (Kumar *et al.*, 2016), assumindo o modelo evolutivo de Kimura 2-parâmetros (K-2P). A confiabilidade dos agrupamentos na árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) foi estimada pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudo-réplicas. Apenas os ramos com valores acima de 80% foram considerados para posterior discussão dos resultados.

4.5 Análises filogenéticas e tempo de divergência

Com o objetivo de determinar as relações evolutivas entre os representantes de *Macrodon* do litoral brasileiro, foram construídas árvores filogenéticas não calibradas por máxima verossimilhança (ML) no *RAxML-HPC (Blackbox)* v. 8.2.10, e inferência Bayesiana (BI) usando *MrBayes on (XSEDE)* v. 3.2.6 na plataforma online CIPRES v. 3.3 (*Cyber Infrastructure for Phylogenetic Research*). Os modelos de substituição de nucleotídeo foram determinados no *jModeltest* v. 2.1.10 (Posada, 2003) pelo Critério de Informação de Akaike

(AIC). Para os genes mitocondriais, os modelos escolhidos foram TPM2+G (16S), HKY+G (COI) e HKY+G (CYT-B), enquanto os modelos evolutivos para os locos nucleares foram K80+I (TMO-4C4) e TPM1uf (RHO).

A confiabilidade dos agrupamentos foi estimada pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudo-réplicas na árvore por ML e pelo valor de probabilidade *a posteriori* na árvore por BI. Para enraizar a árvore filogenética, foram utilizadas sequências de *Cynoscion jamaicensis*, *C. reticulatus*, *C. regalis* e *Isopisthus parvipinnis* disponíveis no GenBank (Tabela 4) e de *C. virescens* e *Isopisthus parvipinnis* coletadas no presente estudo.

Tabela 4. Código de sequências utilizadas para polarização das árvores filogenéticas obtidas GenBank.

Espécies	CYT-B	COI	16S	TMO-4C4	RHO
<i>Cynoscion jamaicensis</i>	--	KP331711.1	KP020028.1	KP020085.1	KP020066.1
<i>Cynoscion reticulatus</i>	KP722626.1	KC208678.1	KC208695.1	--	--
<i>Cynoscion regalis</i>	KP722625.1	KX820248.1	AY857947.2	--	--

Uma árvore filogenética calibrada foi inferida para determinar o tempo de divergências das espécies do gênero *Macrodon* com os genes mitocondriais concatenados no BEAST v. 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012). Os arquivos de entrada foram gerados no BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) v. 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012), assumindo-se o modelo evolutivo HKY, relógio molecular estrito, com corrida simulada para 10 milhões de gerações de Cadeias Markov de Monte Carlo (MCMC). A convergência das árvores foi verificada pela análise das MCMC, estacionaridade e dos valores de mistura suficiente de parâmetros (ESS > 200) no Tracer v. 1.6. A árvore consenso calibrada foi montada no TreeAnnotator v. 1.8.2 assumindo 5% de *burn-in* (500.000 gerações). Foi utilizado um valor de 1% como taxa de substituição relativamente conservativa para DNA mitocondrial em peixes (Thomaz *et al.*, 2015).

4.6 Estatística sumária e análise demográfica

Os índices de diversidade de nucleotídica (π ; Nei, 1987) e haplotípica (h ; Nei, 1987), assim como os testes de neutralidade para detectar sinal de expansão populacional - D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) e R_2 (Ramos-Onsins & Rosa, 2002) - foram calculados no DnaSP v. 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009), com significância testada com base em 1000 repetições coalescentes. A quantidade de sítios polimórficos foi determinada no

MEGA v. 7.0.26-1 (Kumar *et al.*, 2016). As análises foram realizadas para todos os genes mitocondriais (16S, CYT-B e COI) para as duas espécies, *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* de todos os pontos amostrados, considerando cada localidade como uma população arbitrária.


4.7 Teste de estrutura genética

Para cada gene mitocondrial, foi calculado o índice de fixação F_{ST} par-a-par a fim de avaliar a diferenciação genética entre os pares de população (Weir & Cockerham, 1984). A partição da variação genética dentro e entre populações foi avaliada através da análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) no Arlequin v. 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Para avaliar a estrutura genética nos pontos coletados, uma imagem vetorial da rede de haplótipo para cada marcador mitocondrial foi gerada no programa PopArt v. 1.7 (Bandelt *et al.*, 1999) usando o método de *Median-Joining network* (Bandelt *et al.*, 1999). Os arquivos de entrada foram gerados no MEGA v. 7.0.26-1 (Kumar *et al.*, 2016).

A análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para cada marcador mitocondrial foi calculado no programa SAMOVA v. 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). As análises foram rodadas variando o número de grupos (K) de dois a sete, para todos os pontos amostrados, (K) dois a cinco para *M. ancylodon* e (K) de dois a três para *M. atricauda*. Assumiu-se a distância de K-2P com 1000 simulações de *annealing processes*. O valor de K escolhido foi aquele que possuiu o maior valor de F_{CT} . Os arquivos de entrada e com as coordenadas geográficas foram gerados no DnaSP v. 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) e no *Microsoft Office Excel 2007*, respectivamente.

A estruturação populacional também foi avaliada por inferência Bayesiana, no BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) v. 6.0 (Corander *et al.*, 2008) para cada marcador mitocondrial. O algoritmo é baseado na frequência de alelos não idêntica para separar as populações, o qual usa otimização estocástica para inferir o número de populações/linhagens. O programa foi corrido com K variando de dois a oito para toda a amostragem, K de um a seis para *M. ancylodon* e K de um a quatro para *M. atricauda*. O número de interações individuais foi de 500, com 20 interações individuais para cada população e número de referência individual de 50. O arquivo de entrada foi gerado no *Microsoft Office Excel 2007*.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) com as sequências de DNA mitocondrial concatenadas foi obtido no programa *Isolation By Distance web Service* v. 3.23 (Jensen *et al.*, 2005). Esse Algoritmo verifica se existe uma correlação significativa entre a diversidade



genética e distribuição geográfica. Para o teste, foi construída uma matriz com o F_{ST} par-a-par e de coordenadas geográficas no *Microsoft Office Excel* 2007. A matriz do F_{ST} par-a-par foi calculada no programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e a de distância geográfica no programa *Geographic Distance Matrix Generator* v. 1.2.3 (Ersts, Internet) .

Para detectar sinal de expansão ou isolamento populacional para as sequências de DNA mitocondrial concatenadas, foi realizada a análise de Coalescência no BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) v. 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012). O arquivo de entrada foi gerado no BEAUti v.1.8.4 assumindo uma corrida de MCMC para 10 milhões de gerações. Para verificar o tamanho populacional ao longo do tempo, foi feita a análise de reconstrução por *Bayesian Skyline Plot* no BEAST v.1.8.4. (Drummond *et al.*, 2012). A verificação dos parâmetros foi realizada pela diagnose das MCMC, estacionaridade e a mistura suficiente de parâmetros (ESS > 200) no Tracer v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014).

4.8 Construção e edição de mapas e figuras.

O programa Diva-Gis v. 7.5 foi utilizado para a elaboração dos mapas do presente trabalho utilizando os *shapefiles* do Brasil, divisão política do Brasil e de relevo (elevações) do continente Sul Americano. Os programas Inkscape v.3 e *Paint* foram usados para a edição dos mapas e figuras.

5. RESULTADOS

5.1 Análise das sequências

As sequências do gene ribossomal 16S apresentaram 515 pb (n = 102 espécimes), com 12 sítios polimórficos, constituídas em média de 24,2% de timina (T), 24% de citosina (C), 28,7% de adenina (A) e 23,2% de guanina (G). O COI apresentou um total de 616 pb (n = 80), com 34 sítios variáveis e composição de 27,2% de T, 30,3% C, 22,6% A e 19,9% G. Para o CYT-B, foram obtidos 818 pb (n = 65) com 35 sítios polimórficos, apresentando 29,6% de T, 32,7% C, 22,2% A e 26,6% G. O conjunto dos genes mitocondriais totalizou 1949 pb com 81 sítios polimórficos.

Ambos marcadores nucleares apresentaram conjuntamente 950 pb e 5 sítios polimórficos, sendo 495 pb para TMO-4C4 (n = 90) com 4 sítios variáveis e composição de 26,1% T, 20,7% C, 26,7% A e 26,6% G). Por outro lado, o gene da rodopsina (RHO) apresentou 455 pb (n = 96), com 1 sítio variável, constituída por 29,2% de T, 27,8% C, 18,9% A e 24% G.

5.2 Análise de distância genética e árvore de *Neighbor-Joining*

As árvores de *Neighbor-Joining* para cada marcador mitocondrial mostraram a mesma topologia, sustentando a formação de dois grandes clados. O primeiro clado é formado por indivíduos de *Macrodon ancylodon* (Valença-BAVA, Itacaré-BAIT, Ilhéus-BAIL, Porto Seguro-BAP, Mucuri-BAMU, e Conceição da Barra-ESCB) e o segundo inclui as amostras de *Macrodon atricauda* (Mucuri, Conceição da Barra, Aracruz-ESAR e Macaé-RJMA), com altos valores de *bootstrap* (>99%) para a maioria dos ramos e genes (Fig. 10 a 12). Os marcadores nucleares apresentaram uma árvore politômica, não separando as duas espécies devido à grande similaridade das sequências (Fig. 13-14). Por este motivo, os genes nucleares não foram utilizados para inferências de diversidade genética, neutralidade e estruturação populacional.

Observamos uma região de simpatria para as espécies com os marcadores mitocondriais nas localidades de Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES (Fig. 15), uma vez que espécimes de ambas as localidades agruparam nos clados de *M. ancylodon* e *M. atricauda* (Fig. 10 a 12).

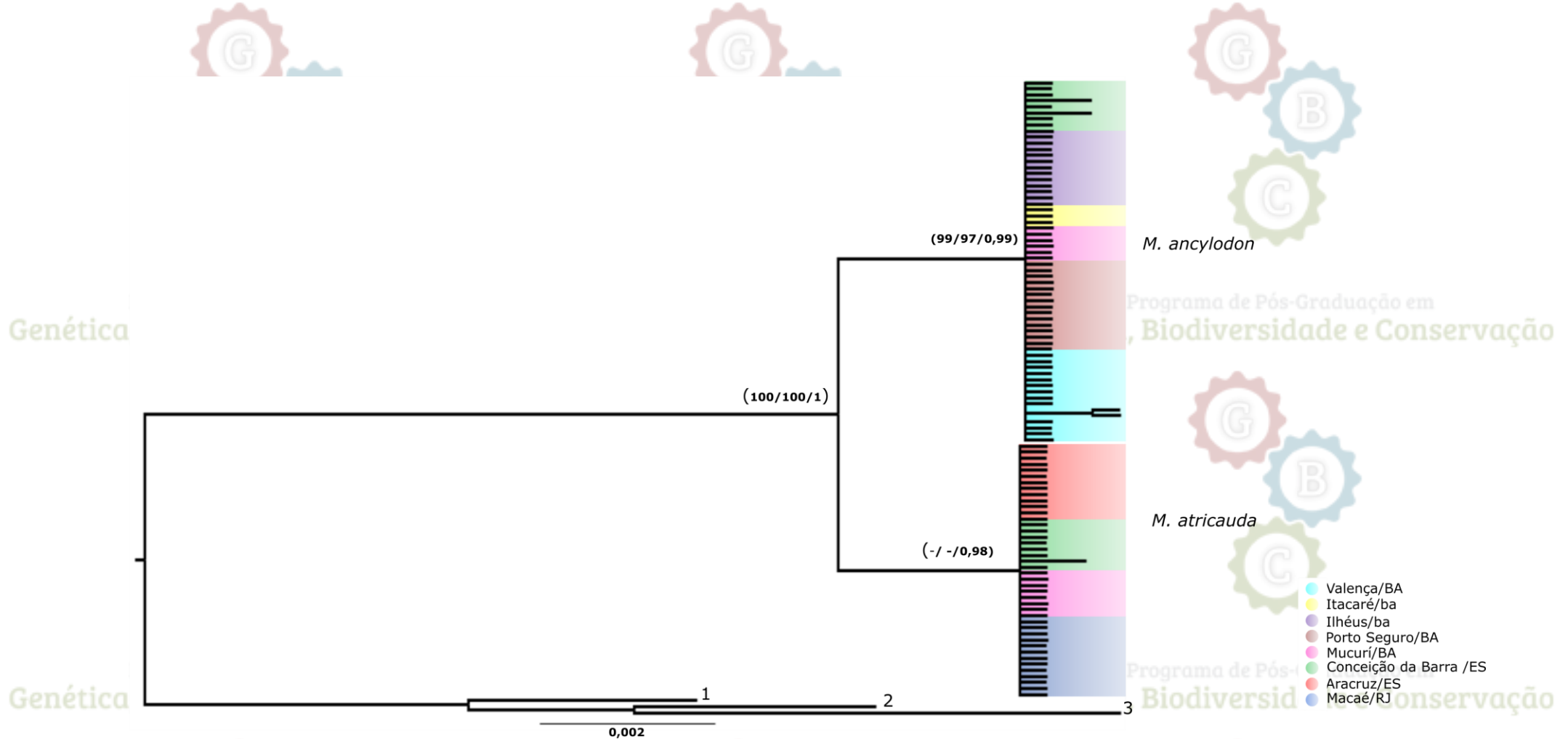


Figura 10. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial 16S. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Isopisthus parvipinnis* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*.

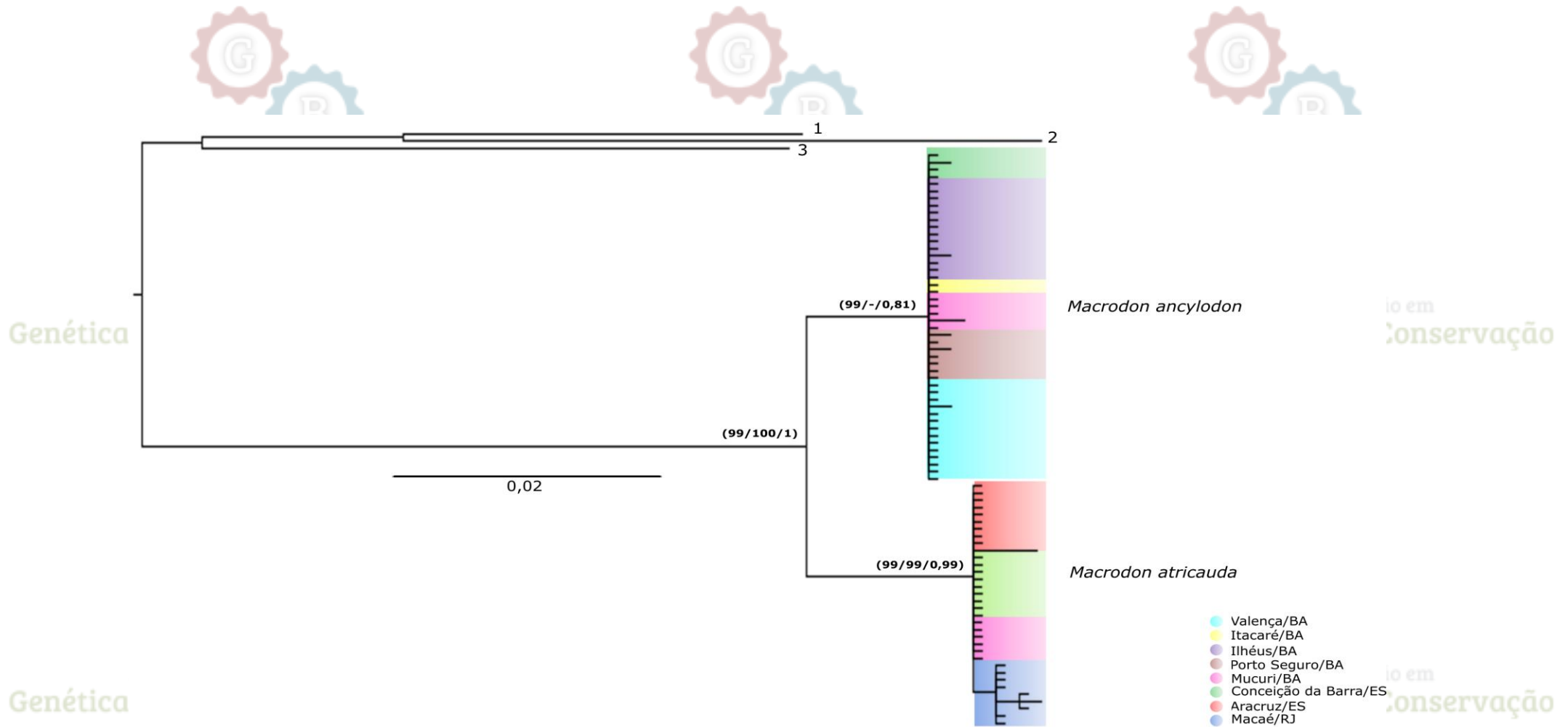


Figura 11. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial COI. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Isopisthus parvipinnis*, 2 = *Cynoscion virescens* e 3 = *Cynoscion jamaicensis*.

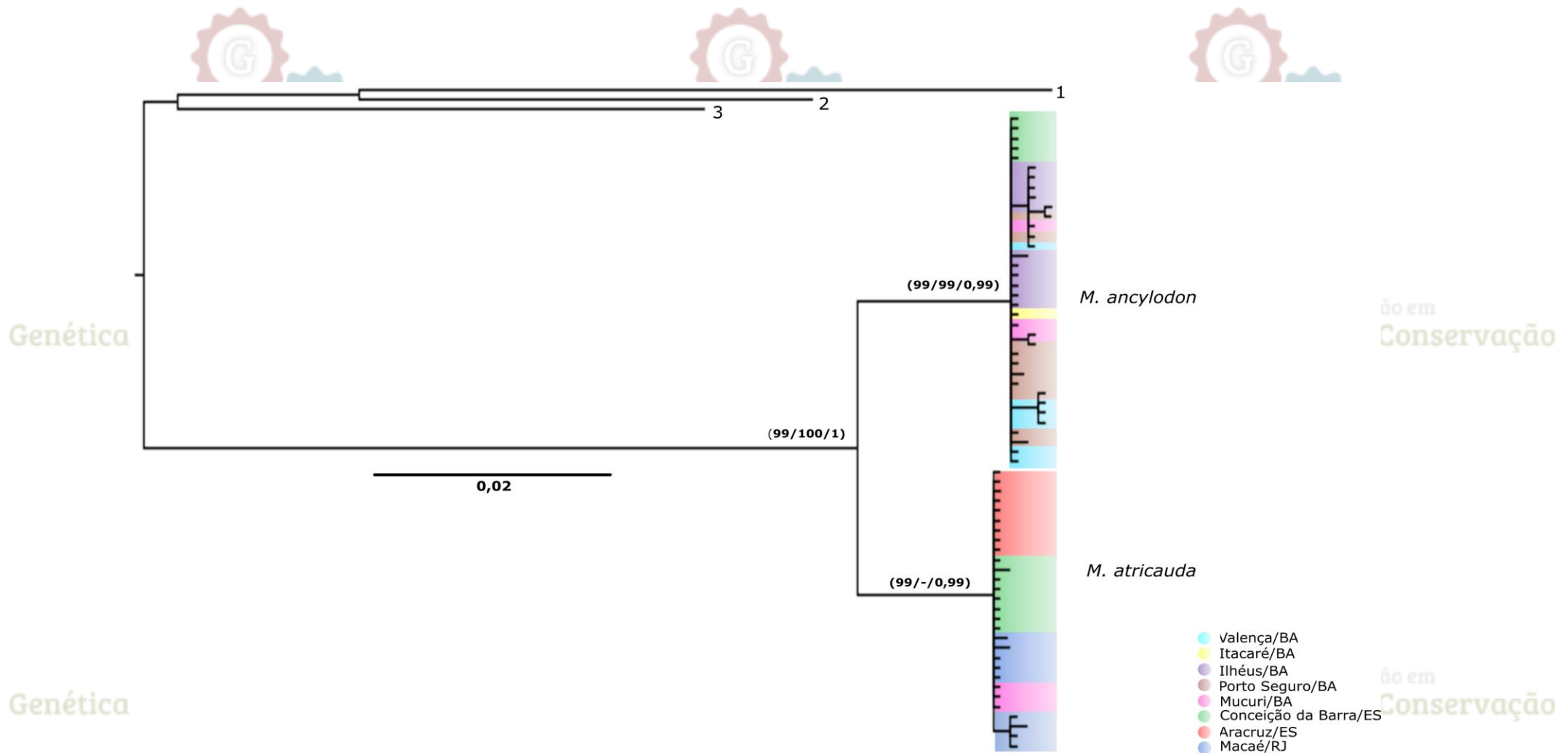


Figura 12. Árvore filogenética para *Macrodon ancyllodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador mitocondrial CYT-B. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Cynoscion reticulatus* e 3 = *Cynoscion regalis*.

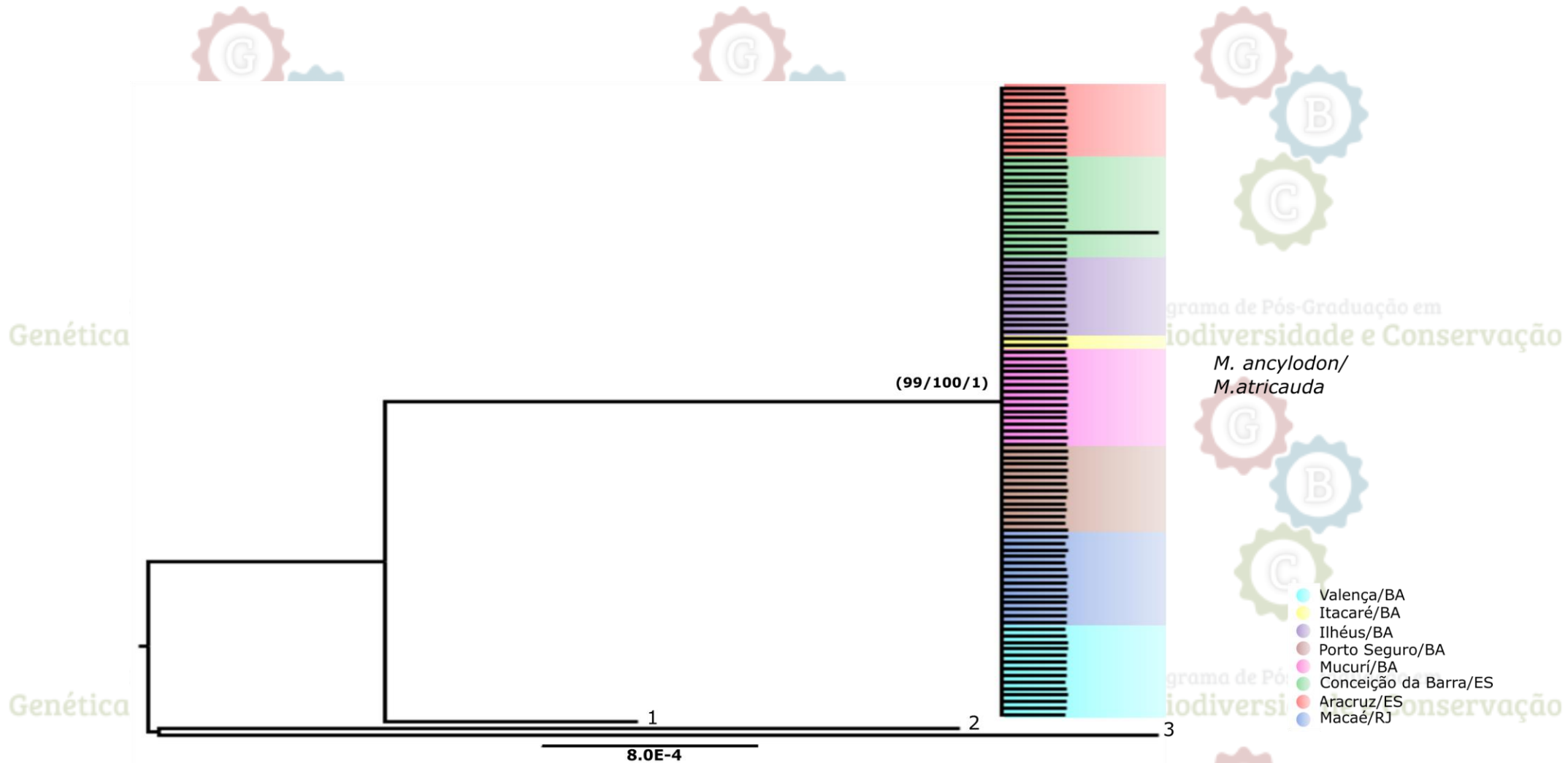


Figura 14. Árvore filogenética para *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* amostradas ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, inferidas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) com marcador nuclear RHO. Os valores entre parênteses representam o suporte para os ramos, em que os dois primeiros indicam *bootstrap* para NJ e ML, respectivamente, e o terceiro a probabilidade *a posteriori* para BI. Somente valores > 80% são mostrados. O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion jamaicensis*, 2 = *Isopisthus parvipinnis* e 3 = *Cynoscion virescens*.

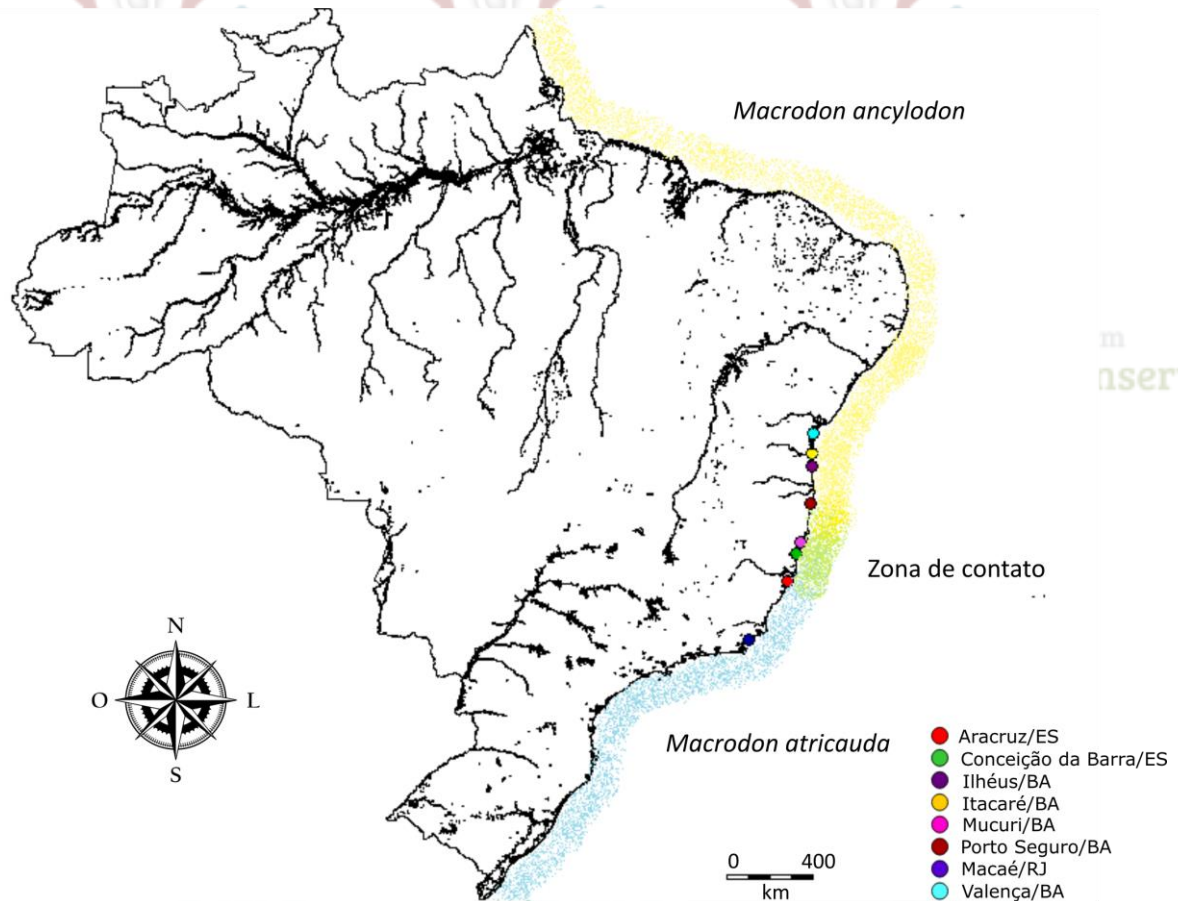


Figura 15. Área de distribuição para *Macrodon ancylodon* (amarelo) e *M. atricauda* (azul) descrita por Carvalho-Filho *et al.* (2010), com a inclusão da nova área de simpatria (verde) para as duas espécies entre Mucuri/BA e Conceição da Barra/ES identificada nesse estudo.

O agrupamento formado pela análise de *Neighbor-Joining* foi considerado para a análise de distância, ou seja, as populações de Mucuri/BA (BAMU) e Conceição da Barra/ES (ESCB) foram separadas em dois grupos, um pertencente ao clado *M. ancylodon* (BAMU/MAC e ESCB/MAC) e outra para *M. atricauda* (BAMU/MAT e ESCB/MAT).

A análise de distância par-a-par entre os grupos amostrados (Tabelas 5 a 7) não evidenciou uma variação genética intraespecífica para o gene 16S, mas variou de 0 a 0,3% para o COI e de 0 a 0,2% para o CYT-B. A variação interespecífica par-a-par para o 16S foi de 1,6%, enquanto para os genes COI e CYT-B ela variou de 3,3 a 3,5% e de 3,4 a 3,5%, respectivamente. Os espécimes de *M. atricauda* e *M. ancylodon* encontrados em simpatria nos estuários do Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES (Fig. 15) apresentaram valores de distância interespecífica similares àqueles observados entre populações alopátricas de cada espécie (Tabelas 5 a 7).

Tabela 5. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o gene de rRNA 16S.

	ESAR	ESCB/MAT	ESCB/MAC	BAIL	BAIT	BAMU/MAT	BAMU/MAC	BAP	RJMA	BAVA	GE
ESAR	-										
ESCB/MAT	0,000	-									
ESCB/MAC	0,016	0,016	-								
BAIL	0,016	0,016	0,000	-							
BAIT	0,016	0,016	0,000	0,000	-						
BAMU/MAT	0,000	0,000	0,016	0,016	0,016	-					
BAMU/MAC	0,016	0,016	0,000	0,000	0,000	0,016	-				
BAP	0,016	0,016	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	-			
RJMA	0,000	0,000	0,016	0,016	0,016	0,000	0,016	0,016	-		
BAVA	0,016	0,016	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,016	-	
GE	0,055	0,055	0,056	0,056	0,056	0,055	0,056	0,056	0,055	0,056	-

Tabela 6. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o marcador COI.

	ESAR	ESCB/MAT	ESCB/MAC	BAIL	BAIT	BAMU/MAT	BAMU/MAC	BAP	RJMA	BAVA	GE
ESAR	-										
ESCB/MAT	0,001	-									
ESCB/MAC	0,035	0,034	-								
BAIL	0,034	0,033	0,001	-							
BAIT	0,034	0,033	0,000	0,000	-						
BAMU/MAT	0,001	0,000	0,034	0,033	0,033	-					
BAMU/MAC	0,035	0,034	0,001	0,001	0,001	0,034	-				
BAP	0,035	0,034	0,001	0,001	0,001	0,034	0,001	-			
RJMA	0,003	0,003	0,035	0,035	0,035	0,003	0,036	0,035	-		
BAVA	0,034	0,033	0,001	0,000	0,000	0,033	0,001	0,001	0,035	-	
GE	0,165	0,164	0,163	0,163	0,163	0,164	0,163	0,163	0,166	0,163	-

Tabela 7. Distância par-a-par determinada pelo método K-2P para o marcador CYT-B.

	ESAR	ESCB/MAT	ESCB/MAC	BAIL	BAIT	BAMU/MAT	BAMU/MAC	BAP	RJMA	BAVA	GE
ESAR	-										
ESCB/MAT	0,000	-									
ESCB/MAC	0,034	0,034	-								
BAIL	0,035	0,035	0,001	-							
BAIT	0,034	0,034	0,000	0,001	-						
RJMA	0,001	0,001	0,034	0,035	0,034	-					
BAMU/MAT	0,000	0,000	0,034	0,035	0,034	0,001	-				
BAMU/MAC	0,035	0,035	0,001	0,001	0,001	0,035	0,035	-			
BAP	0,035	0,035	0,001	0,002	0,001	0,035	0,035	0,002	-		
BAVA	0,035	0,035	0,001	0,002	0,001	0,035	0,035	0,002	0,002	-	
GE	0,152	0,152	0,156	0,156	0,156	0,152	0,152	0,155	0,156	0,155	-

5.3 Análise filogenética e tempo de divergência.

As relações filogenéticas para todos os genes mitocondriais por ML e BI apresentaram a mesma topologia, recuperando o monofiletismo para *M. ancylodon* e *M. atricauda* com altos valores de *bootstrap* e de probabilidade *a posteriori* (>98%) na maioria dos ramos. O clado de *M. ancylodon* foi representado pelas populações da Bahia e alguns indivíduos de Conceição da Barra/ES enquanto o clado *M. atricauda* foi composto pelas populações do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Mucuri-BA (Fig. 10 a 12). No caso dos genes nucleares, as árvores filogenéticas não foram capazes de discriminar as duas espécies (Fig. 13-14).

A árvore filogenética calibrada para os três marcadores mitocondriais concatenados estimou uma data de dispersão entre *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* há 1,5 milhões de anos (mya) no Pleistoceno. Observamos um evento de expansão populacional, datado em aproximadamente 0,2 mya no Holoceno, em ambas as espécies. Em *M. atricauda*, foi indicado um evento de isolamento populacional no Rio de Janeiro (Fig. 16). Deve-se destacar que os eventos de divergência entre *M. ancylodon* e *M. atricauda*, assim como os eventos de expansão e isolamento, apresentaram suportes estatisticamente significativos (>98%).

5.4 Estatística sumária

Para o 16S, encontramos seis haplótipos, quatro deles de *M. ancylodon* (diversidade haplotípica - Hd = 0,129 e diversidade nucleotídica - π = 0,00026) e dois para *M. atricauda* (Hd = 0,048 e π = 0,00009). A maior diversidade foi encontrada em espécimes de Conceição da Barra (Hd = 0,524, π = 0,00111 para *M. ancylodon* e Hd = 0,048 e π = 0,00009 para *M. atricauda*).

No caso do COI, encontramos 12 haplótipos, sete deles para *M. ancylodon* (Hd = 0,246 e π = 0,00049) e cinco para *M. atricauda* (Hd = 0,480 e π = 0,0014). Para a primeira espécie, a maior diversidade foi detectada na população de Porto Seguro (Hd = 0,524 e π = 0,00093), enquanto, para *M. atricauda*, o COI foi mais variável nas amostras do Rio de Janeiro (Hd = 0,556 e π = 0,001177) (Tabelas 8 e 9).

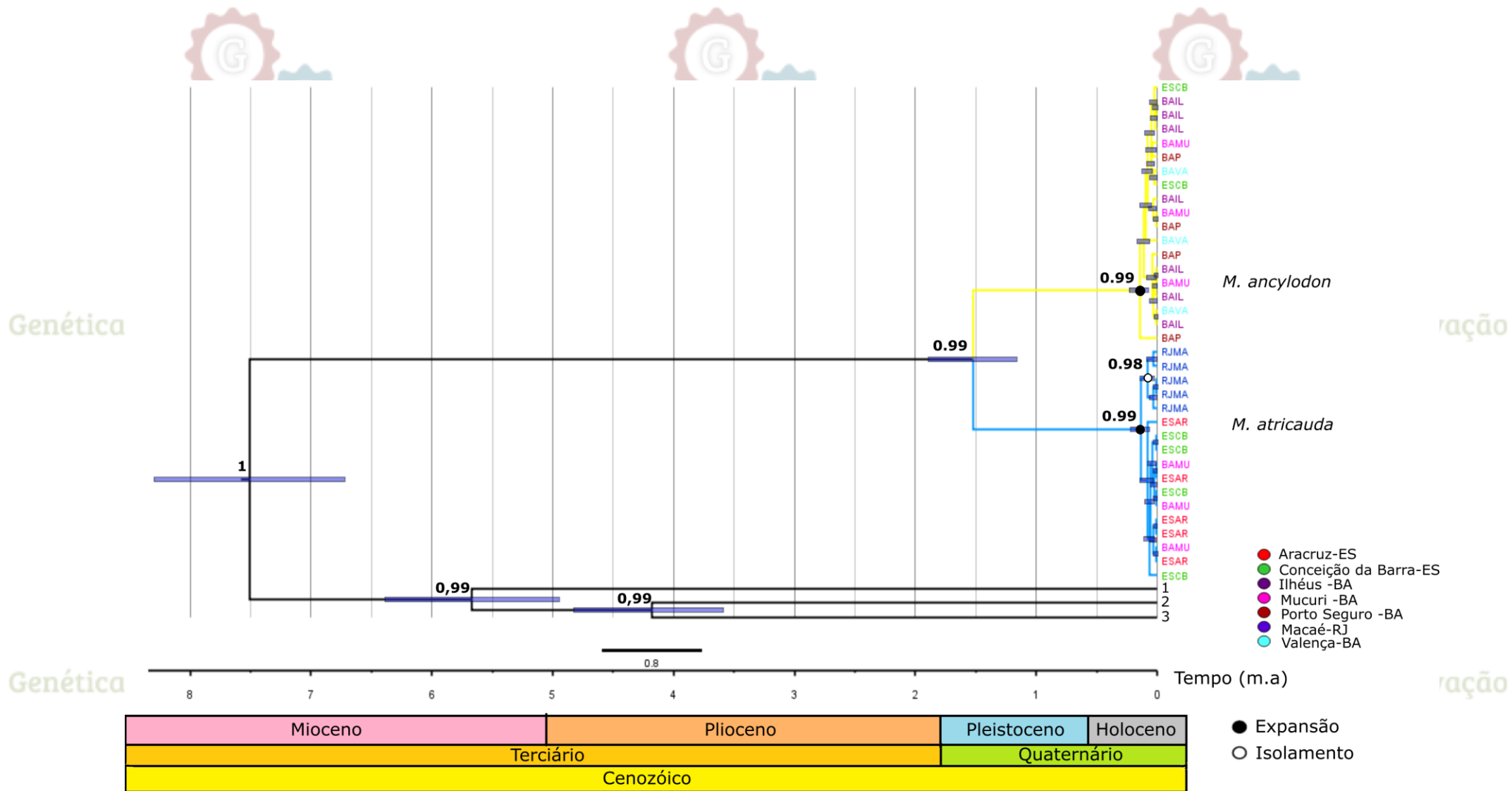


Figura 16. Árvore filogenética com tempo de divergência em milhares de anos (mya) para *Macrodon ancyledon* e *M. atricauda*, baseada em nos genes mitocondriais 16S, COI e CYT-B concatenados, estimada pela análise Bayesiana coalescente. As barras em azul representam 95% de HPD (*Highest posterior densities*). O grupo externo é representado por 1 = *Cynoscion virescens*, 2 = *Cynoscion reticulatus* e 3 = *Cynoscion regalis*.

Um total de 14 haplótipos foi recuperado para o CYT-B, oito deles em *M. ancylodon* ($Hd = 0,711$ e $\pi = 0,00144$), e seis para *M. atricauda* ($Hd = 0,424$ e $\pi = 0,00064$), com maior diversidade para as populações de Mucuri ($Hd = 1$ e $\pi = 0,00163$) e Rio de Janeiro ($Hd = 0,833$ e $\pi = 0,00149$), respectivamente. Porém a alta diversidade encontrada na população de Mucuri de *M. ancylodon* pode estar enviesada em função da baixa amostragem, composta por apenas três indivíduos com haplótipos distintos entre si. (Tabela 10).

Como os dados genéticos (Fig. 10 a 12) evidenciaram (Fig. 10 a 12) uma região de simpatria para *M. ancylodon* e *M. atricauda* em Mucuri e Conceição da Barra entre a costa nordeste e sudeste do Brasil, as inferências de diversidade, neutralidade e estruturação populacional baseadas exclusivamente nos locais de coleta causariam uma falsa impressão de alta diversidade nessas duas localidades (Fig. 17). Dessa forma, as análises foram realizadas levando em consideração tanto a localidade quanto a identidade genética de cada espécie, de modo que as populações de Mucuri e Conceição da Barra foram subdivididas para *M. ancylodon* e *M. atricauda* (Fig.18).

Tabela 8. Teste de diversidade e neutralidade em *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* com 16S.

Pontos Amostrados	N	H	Hd	S	π	Fs	D	R ₂
BAVA	15	2	0,248	1	0,00048	0,133	-0,39883	0,1238
BAIT	3	1	0	0	0	-	-	-
BAIL	14	1	0	0	0	-	-	-
BAP	15	1	0	0	0	-	-	-
BAMU	14	2	0,527	8	0,00819	8,069	2,55452*	0,2637
BAMU/MAC	6	1	0	0	0	-	-	-
BAMU/MAT	8	1	0	0	0	-	-	-
ESCB	15	5	0,705	11	0,00906	2,7	1,46252	0,1973
ESCB/MAC	7	3	0,524	2	0,00111	-0,922	-1,23716	0,2259
ESCB/MAT	8	2	0,25	1	0,00049	-0,182	-1,05482	0,3307
ESAR	13	1	0	0	0	-	-	-
RJMA	13	1	0	0	0	-	-	-
<i>M. ancylodon</i>	60	4	0,129	3	0,00026	-3,922**	-1,5765	0,0608
<i>M. atricauda</i>	42	2	0,048	1	0,00009	-1,491	-1,11966	0,1525**
Todas Populações	102	6	0,542	12	0,00779	6,553	1,95282	0,1653

(N = número do indivíduo sequenciado, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, S = sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica, Fs = teste Fs de Fu e D = teste D de Tajima e R₂ = teste de Ramos-Onsins & Rosa, 2002). *P < 0,01 **P < 0,05

Tabela 9. Teste de diversidade e neutralidade em *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* com COI.

Pontos Amostrados	N	H	Hd	S	π	Fs	D	R ₂
BAVA	14	2	0,143	1	0,00023	-0,595	-1,15524	0,2575
BAIT	2	1	0	0	0	-	-	-
BAIL	14	2	0,143	1	0,00023	-0,595	-1,15524	0,2575
BAP	7	3	0,524	2	0,00093	-0,922	-1,23716	0,2259
BAMU	11	3	0,618	23	0,01919	9,699	2,30803**	0,2503
BAMU/MAC	5	2	0,4	2	0,0013	1,04	-0,97256	0,4
BAMU/MAT	6	1	0	0	0	-	-	-
ESCB	13	3	0,5	22	0,01598	9,81	1,67456	0,2206
ESCB/MAC	4	2	0,5	1	0,00081	0,17	-0,61237	0,433
ESCB/MAT	9	1	0	0	0	-	-	-
ESAR	10	2	0,2	4	0,0013	1,744	-1,66706	0,3
RJMA	9	3	0,556	2	0,00117	-0,239	-0,06382	0,2008
<i>M. ancylodon</i>	46	7	0,246	7	0,00049	-7,13**	-2,1759**	0,0593
<i>M. atricauda</i>	34	5	0,48	7	0,0014	-0,892	-1,42649	0,1068
Todas Populações	80	12	0,661	34	0,01767	8,459	1,85011	0,1565*

(N = número do indivíduo sequenciado, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, S = sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica, Fs = teste Fs de Fu e D = teste D de Tajima e R₂ = teste de Ramos-Onsins & Rosa, 2002). *P < 0,01 **P < 0,05

Tabela 10. Teste de diversidade e neutralidade em *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* com CYT-B.

Pontos Amostrados	N	H	Hd	S	π	Fs	D	R ₂
BAVA	6	3	0,733	3	0,00187	0,54	0,86222	0,2354
BAIT	1	-	0	0	-	-	-	-
BAIL	11	4	0,709	3	0,00111	-0,94	-0,38482	0,1575
BAP	10	7	0,867	7	0,0019	-4,136**	-1,57285	0,0981**
BAMU	6	4	0,8	29	0,02062	3,771	2,07584**	0,2798
BAMU/MAC	3	3	1	2	0,00163	-1,216	***	0,2357
BAMU/MAT	3	1	0	0	0	-	-	-
ESCB	13	3	0,603	28	0,01711	12,289	2,41058*	0,2474
ESCB/MAC	5	1	0	0	-	-	-	-
ESCB/MAT	8	2	0,25	1	0,00031	-0,182	-1,05482	0,3307
ESAR	9	1	0	0	0	-	-	-
RJMA	9	5	0,833	4	0,00149	-1,995**	-0,68914	0,1368**
<i>M. ancylodon</i>	36	8	0,711	8	0,00144	-2,917**	-1,14071	0,0718
<i>M. atricauda</i>	29	6	0,424	29	0,00064	-3,829**	-1,62347	0,0732
Todas Populações	65	14	0,8	35	0,01748	7,864	2,56886**	0,2022

(N = número do indivíduo sequenciado, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, S = sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica, Fs = teste Fs de Fu e D = teste D de Tajima e R₂ = teste de Ramos-Onsins & Rosa, 2002). *P < 0,01 **P < 0,05, *** Não calculado teste D de Tajima (n < 4).

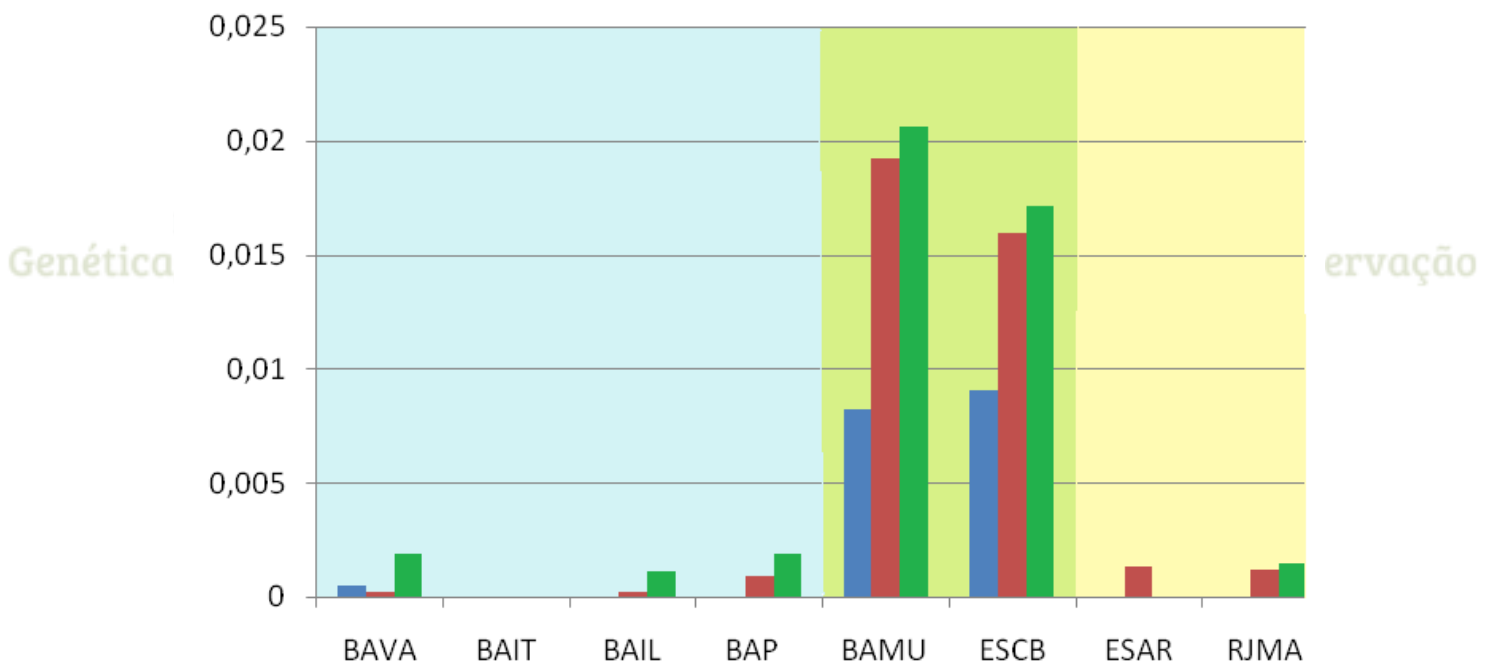


Figura 17. Variação de diversidade de nucleotídeo baseada nas tabelas 8 a 10 para os pontos amostrados. Em azul claro está indicada a distribuição de *M. ancyloдон*, em amarelo claro, a distribuição de *M. atricauda* e verde claro representa a região de sympatria. As barras representam os genes 16S (azul escuro), COI (vermelho) e CYT-B (verde escuro).

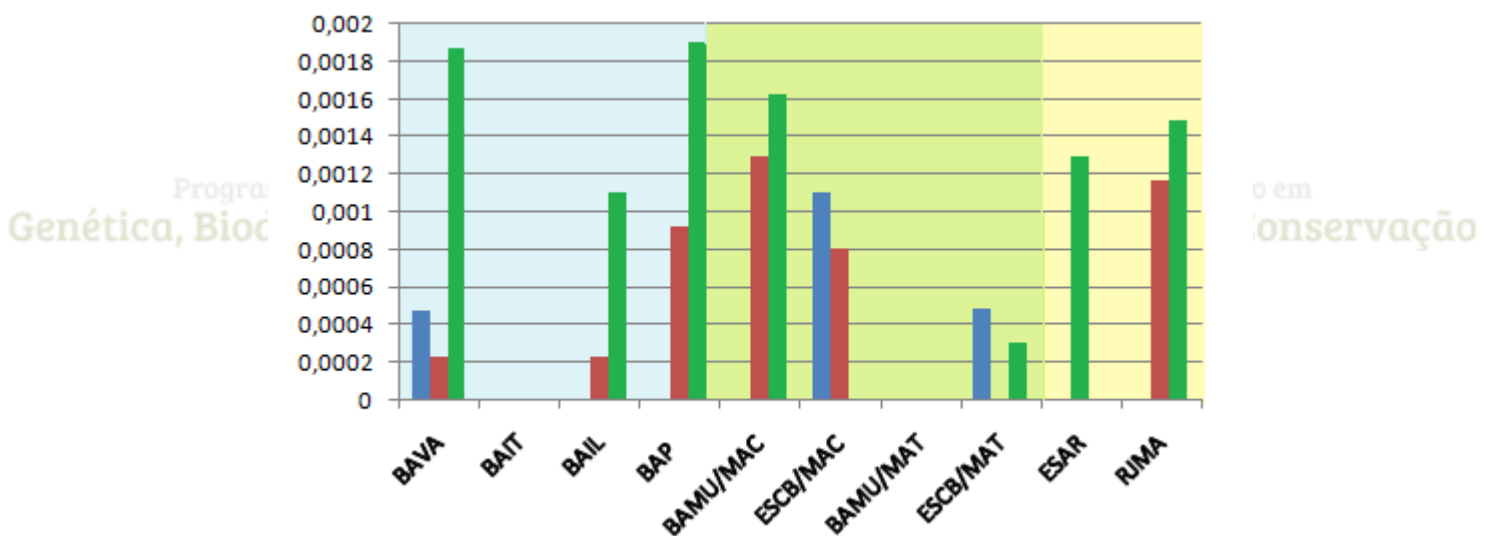


Figura 18. Real distribuição da diversidade de nucleotídeo para *M. ancyloдон* e *M. atricauda* ao longo da costa da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Em azul claro, está indicada a distribuição de *M. ancyloдон*, em amarelo claro, a distribuição de *M. atricauda* e, em verde claro, está representada a região de sympatria. As barras representam os genes 16S (azul escuro), COI (vermelho) e CYT-B (verde escuro).

Adicionalmente, os valores observados de diversidade para o CYT-B entre a região da Bahia e Rio de Janeiro amostrada no presente trabalho foram moderados ou baixos quando comparados aos dados disponíveis na literatura para outras regiões (Santos *et al.*, 2006) (Fig.

19). Considerando esse conjunto de dados, demonstra-se que a maior diversidade para *M. ancyllodon* foi detectada em populações de Pernambuco ($\pi = 0,003$) enquanto a população de São Paulo ($\pi = 0,0027$) apresentou maior variação para *M. atricauda*. Infelizmente, para os outros marcadores não há dados publicados de diversidade nucleotídica para análises comparativas.

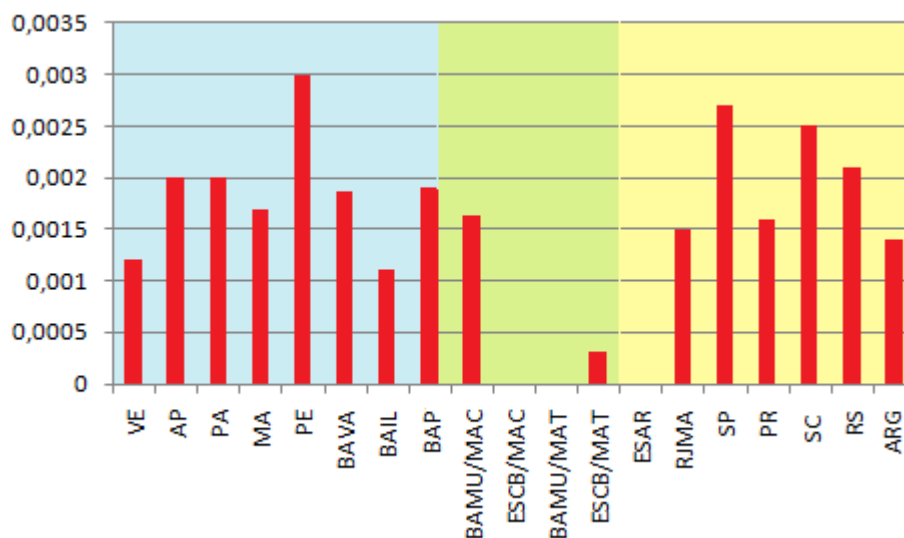


Figura 19. Diversidade de nucleotídeo para CYT-B ao longo da área de distribuição para *M. ancyllodon* e *M. atricauda* no Atlântico Sul Ocidental com base nos dados de presente estudo (BAVA até RJMA) e publicados por Santos *et al.* (2006) (VE até PE e SP até ARG) e dados do presente trabalho (BAVA-RJMA). Em azul claro, indica-se a distribuição de *M. ancyllodon*, em amarelo claro a distribuição de *M. atricauda* e, em verde claro, a região de contato. (VE - Venezuela; AP - Amapá; PA - Pará; MA - Maranhão; PE - Pernambuco; SP - São Paulo; PR - Paraná; SC - Santa Catarina; RS - Rio Grande do Sul e ARG - Argentina).

5.5 Estrutura genética

A análise de F_{ST} com os marcadores mitocondriais (16S, COI e CYT-B) reunindo *M. ancyllodon* e *M. atricauda* indicou uma alta estruturação populacional (0,95 a 0,98), com maior variação entre as populações do que dentro das populações (Tabela 11), conforme esperado para espécies distintas. Porém, quando cada espécie foi analisada separadamente, observou-se uma baixa estruturação populacional (0,04 a 0,34 para *M. ancyllodon* e 0,04 a 0,55 para *M. atricauda* a depender do marcador). Em *M. ancyllodon* a maior variação foi detectada dentro das populações do que entre populações independentemente do gene analisado, enquanto *M. atricauda* só seguiu esse padrão para o gene 16S (Tabela 11).

Tabela 11. Estruturação populacional (F_{ST}) para *M. ancylodon* e *M. atricauda* com os marcadores mitocondriais 16S, COI e CYT-B.

	16S			COI			CYT-B		
	Geral	MAC	MAT	Geral	MAC	MAT	Geral	MAC	MAT
F_{ST}	0,9790*	0,0419	0,0431	0,9709*	0,3428	0,55642*	0,9485*	0,0637	0,1506*
Entre Pop	97,90%	4,19%	4,32%	97,09%	3,43%	56,43%	94,88%	6,38%	84,93%
Dentro Pop	2,10%	95,81%	95,68%	2,91%	96,57%	47,57%	5,12%	93,62%	15,07%

(Geral = *M. ancylodon* + *M. atricauda*; MAC = *M. ancylodon*; MAT = *M. atricauda*; Pop = população). * $P < 0,05$.

As comparações de F_{ST} par-a-par para os três marcadores mitocondriais apóiam a alta diferenciação genética entre *M. ancylodon* (Bahia) e *M. atricauda* (Espírito Santo e Rio de Janeiro), com valores significativos de 0,95 a 1 de acordo com o gene analisado (Tabelas 12 a 14). Ressalta-se que as comparações entre espécimes de *M. ancylodon* e *M. atricauda* nas regiões de simpatria em Mucuri-BA (BAMU/MAC x BAMU/MAT) e Conceição da Barra-ES (ESCB/MAC x ESCB/MAT) exibiram valores de divergência interespecífica compatíveis com os observados entre as populações alopátricas (0,95 a 1,00 para o 16S; 0,98 a 0,99 para COI; e 0,97 a 0,99 para o CYT-B) (Tabelas 12 a 14). Adicionalmente, a população do Rio de Janeiro apresentou uma moderada estruturação significativa para os marcadores COI e CYT-B em relação às demais populações (Tabelas 13 e 14).

Por outro lado, quando os espécimes de *M. ancylodon* de Mucuri-BA são comparados com as amostras de mesma espécie de Conceição da Barra-ES valores de F_{ST} nulo ou negativo, não significativos, foram encontrados, indicando que representam uma mesma unidade evolutiva. O mesmo padrão foi observado em *M. atricauda* (Tabelas 12 a 14).

As redes de haplótipo separaram claramente *M. ancylodon* e *M. atricauda*, com oito mutações para o gene 16S (Fig. 20A), 20 mutações para o COI (Fig. 20B) e 25 mutações para o CYT-B (Fig. 20C), incluindo haplótipos privados para cada grupo. Novamente, destaca-se que os haplótipos privados que discriminam geneticamente os indivíduos de *M. ancylodon* e *M. atricauda* estavam presentes nas zonas de contato (Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES), constituindo mais uma evidência para a simpatria de ambas. Ademais, não foi detectado compartilhamento de haplótipo entre as espécies com os marcadores utilizados nesse trabalho, mesmo nas regiões de co-ocorrência de *M. ancylodon* e *M. atricauda*.

Tabela 12. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador 16S para *M. ancyloдон* e *M. atricauda* entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.

	ESAR	ESCB/MAC	ESCB/MAT	BAIL	BAIT	BAMU/MAC	BAMU/MAT	BAP	RJMA	BAVA
ESAR	-									
ESCB/MAC	0,97680*	-								
ESCB/MAT	0,06427	0,95259*	-							
BAIL	1,00000*	0,10638	0,98919*	-						
BAIT	1,00000*	-0,16667	0,97619*	0,00000	-					
BAMU/MAC	1,00000*	-0,02439	0,98208*	0,00000	0,00000	-				
BAMU/MAT	0,00000	0,96811*	0,00000	1,00000*	1,00000*	1,00000*	-			
BAP	1,00000*	0,11765	0,98970*	0,00000	0,00000	0,00000	1,00000*	-		
RJMA	0,00000	0,97680*	0,06427	1,00000*	1,00000*	1,00000*	0,00000	1,00000*	-	
BAVA	0,98362*	0,06120	0,96992*	0,06491	-0,13372	-0,01961	0,97979*	0,07143	0,98362*	-

* $P < 0,05$

Tabela 13. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador COI para *M. ancyloдон* e *M. atricauda* entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.

	ESAR	ESCB/MAC	ESCB/MAT	BAIL	BAIT	BAMU/MAC	BAMU/MAT	BAP	RJMA	BAVA
ESAR	-									
ESCB/MAC	0,96659*	-								
ESCB/MAT	-0,01124	0,99356*	-							
BAIL	0,98078*	0,13903	0,99581*	-						
BAIT	0,96658	-0,26316	1,00000*	-0,32847	-					
BAMU/MAC	0,96330*	-0,01293	0,98748*	0,13071	-0,29032	-				
BAMU/MAT	-0,05882	0,99116*	0,00000	0,99511*	1,00000*	0,98336*	-			
BAP	0,96735*	-0,00782	0,98848*	0,05474	-0,31250	0,01072	0,98537*	-		
RJMA	0,58652*	0,97001*	0,75000*	0,98332*	0,97069*	0,96625*	0,70492*	0,97021*	-	
BAVA	0,98078*	0,13903	0,99581*	0,00000	-0,32847	0,13071	0,99511*	0,05474	0,98332*	-

* $P < 0,05$

Tabela 14. Diversidade genética (F_{ST} par-a-par) com o marcador CYT-B para *M. ancylodon* e *M. atricauda* entre o litoral Nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil.

	ESAR	ESCB/MAC	ESCB/MAT	BAIL	BAIT	RJMA	BAMU/MAC	BAMU/MAT	BAP	BAVA
ESAR	-									
ESCB/MAC	1,00000*	-								
ESCB/MAT	0,01562	0,99414*	-							
BAIL	0,98175*	0,16540	0,97707*	-						
BAIT	1,00000	0,00000	0,99078	-0,42857	-					
RJMA	0,21429	0,97011*	0,17184	0,96219*	0,95492	-				
BAMU/MAC	0,99028*	0,18919	0,98223*	-0,07164	-1,00000	0,95517*	-			
BAMU/MAT	0,00000	1,00000*	-0,17483	0,97277*	1,00000	0,01737	0,97590	-		
BAP	0,97009*	-0,06061	0,96445*	0,00584	-0,94444	0,94936*	-0,15741	0,95421*	-	
BAVA	0,97858*	0,30373	0,97168*	0,28965*	-0,31429	0,95165*	0,15455	0,96067*	0,09091	-

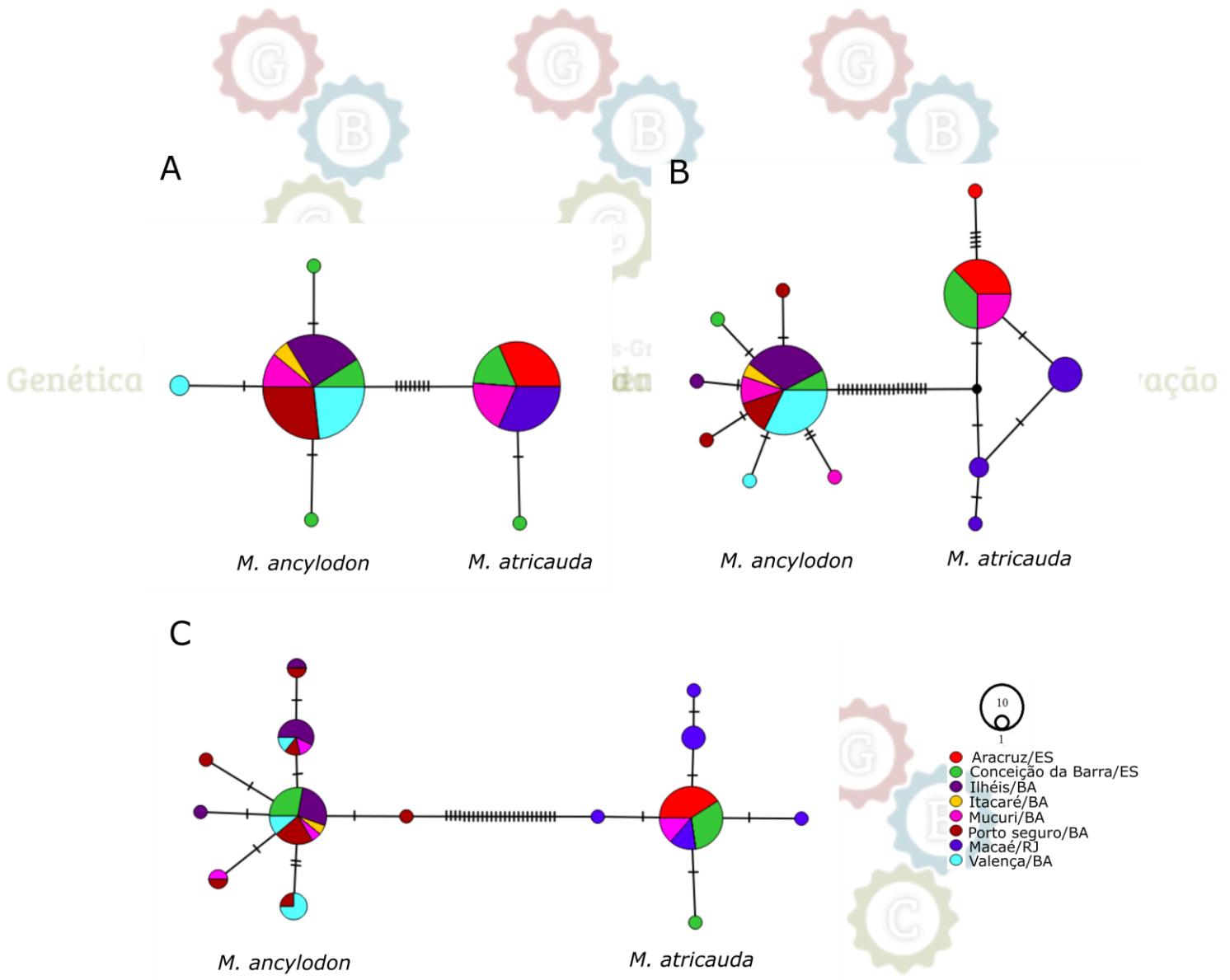


Figura 20. Rede de haplótipos para os marcadores mitocondriais 16S (A), COI (B) e CYT-B (C) para *M. ancyllodon* e *M. atricauda*. A coloração indica as localidades amostradas e o tamanho do círculo reflete a proporção individual dos haplótipos.

A análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para os marcadores mitocondriais reunindo as amostras das duas espécies recuperou três grupos ($K = 3$) ao longo de toda a distribuição (Fig. 21). O primeiro grupo seria formado por *M. atricauda* de Aracruz-ES e Macaé-RJ, o segundo seria composto por *M. ancyllodon* de Valença até Porto seguro na Bahia. O terceiro grupo representa a zona de contato em Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES, recuperado em função da alta estruturação causada pela inclusão de duas espécies distintas que ocorrem nessas áreas (Tabelas 15 a 17).

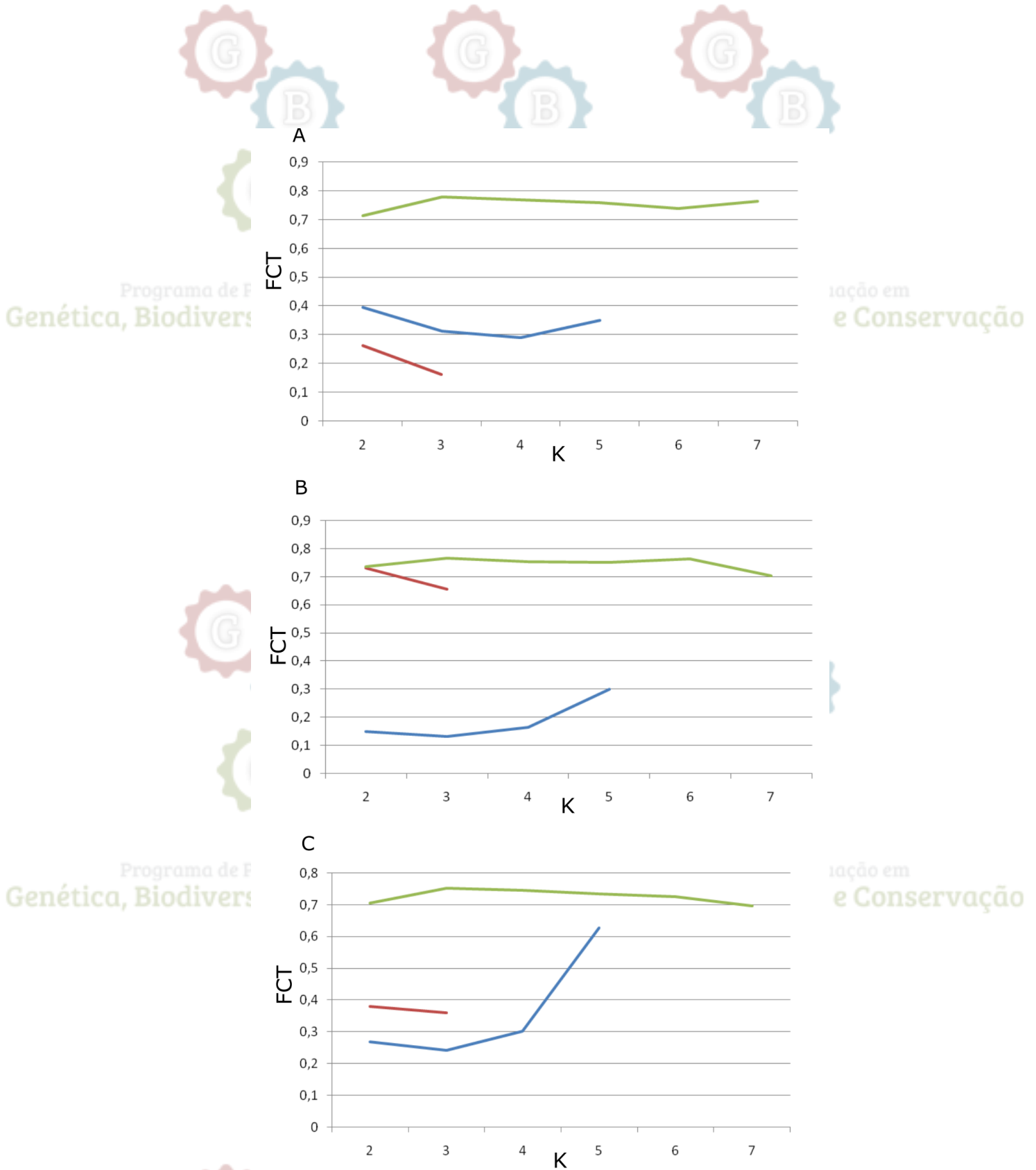


Figura 21. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para 16S (A), COI (B) e CYT-B (C) considerando *M. ancyloдон+M. atricauda* (verde), *M. ancyloдон* (azul) e *M. atricauda* (vermelho), separadamente.

A SAMOVA para *M. ancylodon* separadamente recuperou valores de $K = 2$ (16S) até $K = 5$ (COI, CYT-B), com baixa estruturação populacional (Fig. 21). Porém, os valores de F_{CT} e F_{ST} não foram significativos, com exceção do F_{ST} para o gene 16S (Tabelas 15 a 17). Em *M. atricauda*, todos os genes indicaram $K = 2$, também com baixa estruturação genética e valores significativos apenas para o F_{ST} para o COI (Tabelas 15 a 17).

Tabela 15. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene 16S para *M. ancylodon*, *M. atricauda* e *M. ancylodon*+*M. atricauda* (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .

K	<i>M. ancylodon</i>		<i>M. atricauda</i>		Geral	
	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}
2	0,39475	0,3834*	0,26191	0,18875	0,71300*	0,79187*
3	0,31251*	0,2218*	0,16213	0,06803	0,77878*	0,76121*
4	0,28917	0,15406*	-	-	0,76872*	0,7537*
5	0,34939	0,13252*	-	-	0,75888*	0,74451*
6	-	-	-	-	0,73929*	0,71393*
7	-	-	-	-	0,76354*	0,70354*

* $P < 0,05$

Tabela 16. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene COI para *M. ancylodon*, *M. atricauda* e *M. ancylodon*+*M. atricauda* (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .

K	<i>M. ancylodon</i>		<i>M. atricauda</i>		Geral	
	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}
2	0,14894	0,14206	0,73098	0,71548*	0,73478*	0,7971*
3	0,13132	0,09230	0,65544	0,59987*	0,76500*	0,76442*
4	0,16454	0,08354	-	-	0,75308*	0,75787*
5	0,30097	0,04440	-	-	0,75079*	0,73931*
6	-	-	-	-	0,76163	0,71825*
7	-	-	-	-	0,70300	0,71762*

* $P < 0,05$

Tabela 17. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) com o gene CYT-B para *M. ancylodon*, *M. atricauda* e *M. ancylodon*+*M. atricauda* (Geral). Em destaque, os maiores valores de F_{CT} .

k	<i>M. ancylodon</i>		<i>M. atricauda</i>		Geral	
	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}	F_{CT}	F_{ST}
2	0,26933	0,22558	0,37909	0,28122	0,70623*	0,71194*
3	0,24238	0,11493	0,36049	0,17778*	0,75278*	0,73179*
4	0,30145*	0,08353	-	-	0,7458*	0,720073*
5	0,62788	0,06971	-	-	0,73533*	0,70252*
6	-	-	-	-	0,72624*	0,68587*
7	-	-	-	-	0,69657	0,68414*

* $P < 0,05$

A análise de estruturação populacional por inferência Bayesiana (BAPS) com os três genes mitocondriais com o conjunto de dados de todas as espécies recuperou dois grupos, um para *M. ancylodon* e outro para *M. atricauda* (Fig. 22). Porém, quando cada espécie foi analisada separadamente, foi gerado um padrão heterogêneo de estruturação de acordo com o marcador, variando de $K = 3$ (COI, CYT-B) a $K = 4$ (16S) para *M. ancylodon* e de $K = 2$ (16S) a $K = 4$ (COI, CYT-B) para *M. atricauda* (Fig. 22).

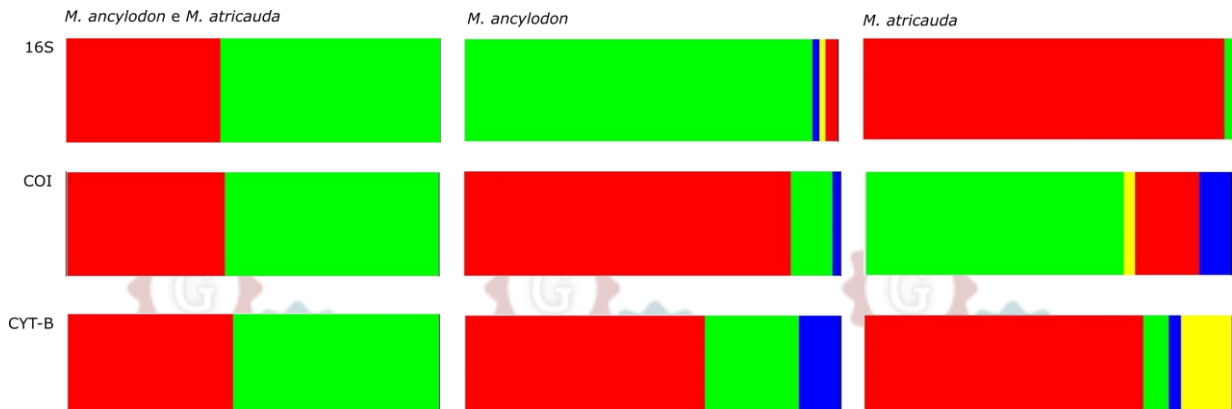


Figura 22. Análise de estruturação populacional por inferência Bayesiana (BAPS) para 16S, COI e CYT-B em *M. ancylodon*+*M. atricauda* (esquerda), *M. ancylodon* (centro) e *M. atricauda* (direita). Na coluna da esquerda as cores vermelho e verde indicam os espécimes de *M. atricauda* e *M. ancylodon*, respectivamente. No caso das análises em *M. ancylodon* e *M. atricauda* isoladamente, as cores predominantes indicam indivíduos que não apresentam diferenças genéticas significativas entre as localidades.

O teste de Mantel com os genes mitocondriais concatenados demonstrou que não há estruturação genética significativa relacionada com a distância geográfica ao se considerar *M. ancylodon*+*M. atricauda* ($r = 0.7465$; $P = 0.99$). Porém não houve correlação entre distâncias genética e geográfica ao se analisar cada espécie separadamente ($r = 0,8679$; $P = 0,77$ para *M. atricauda* e $r = -0,1153$; $P = 0,56$ para *M. ancylodon*) (Fig. 23).

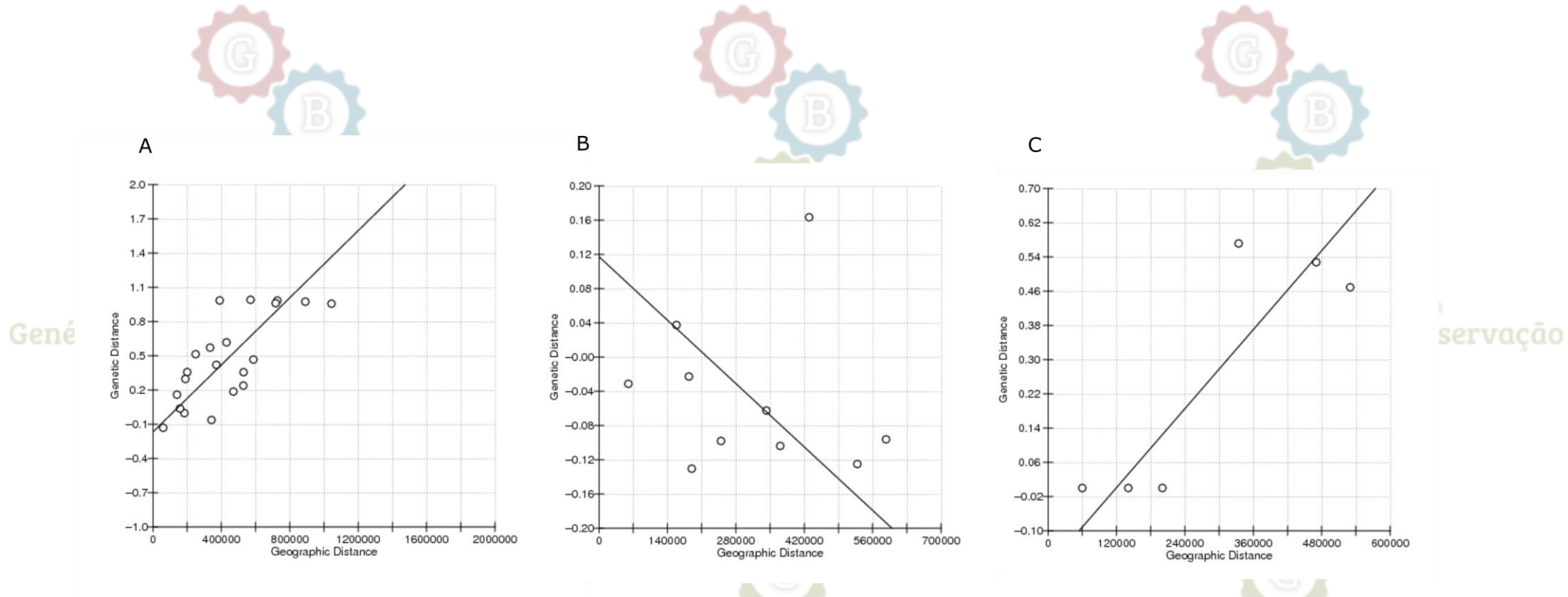


Figura 23. Correlação entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) para amostras de *M. ancylodon* + *M. atricauda* (A) ($r = 0,7465$; $P = 0,99$), *M. ancylodon* (B) ($r = -0,1153$; $P = 0,56$) e *M. atricauda* (C) ($r = 0,8679$, $P = 0,77$).



5.6 Estimativa de expansão populacional

Conforme demonstrado anteriormente nas Tabelas 8 a 10, encontramos sinais de expansão populacional significativos para *M. ancylodon* pelo teste de F_s de Fu (Fu, 1997) com os três marcadores mitocondriais. Porém, o teste D de Tajima (Tajima, 1989) indicou expansão populacional nessa espécie somente para o marcador COI (Tabelas 8 a 10). Ao considerarmos as populações de *M. ancylodon* separadamente, apenas as amostras de Porto Seguro-BA evidenciaram sinal significativo de expansão com o marcador CYT-B para os testes de F_s de Fu e R_2 (Tabelas 8 a 10).

Por outro lado, só foi possível detectar expansão populacional para *M. atricauda* com o teste de F_s de Fu (Fu, 1997) com o gene CYT-B e com o teste de R_2 com o 16S (Tabelas 8 a 10). Na análise por populações de *M. atricauda*, valores significativos de expansão populacional foram encontrados somente na população de Macaé – RJ pelo teste R_2 (Tabelas 8 a 10).

A estimativa demográfica histórica estimada pelo *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) com base nos genes mitocondriais concatenados evidenciou a manutenção no tamanho efetivo (NE) populacional ao longo do tempo para *M. atricauda* (12.500 mil anos até a atualidade). Em *M. ancylodon*, essa análise indicou manutenção do NE de 6 milhões de anos atrás até aproximadamente 150 mil anos, seguida por redução populacional (Fig. 24).

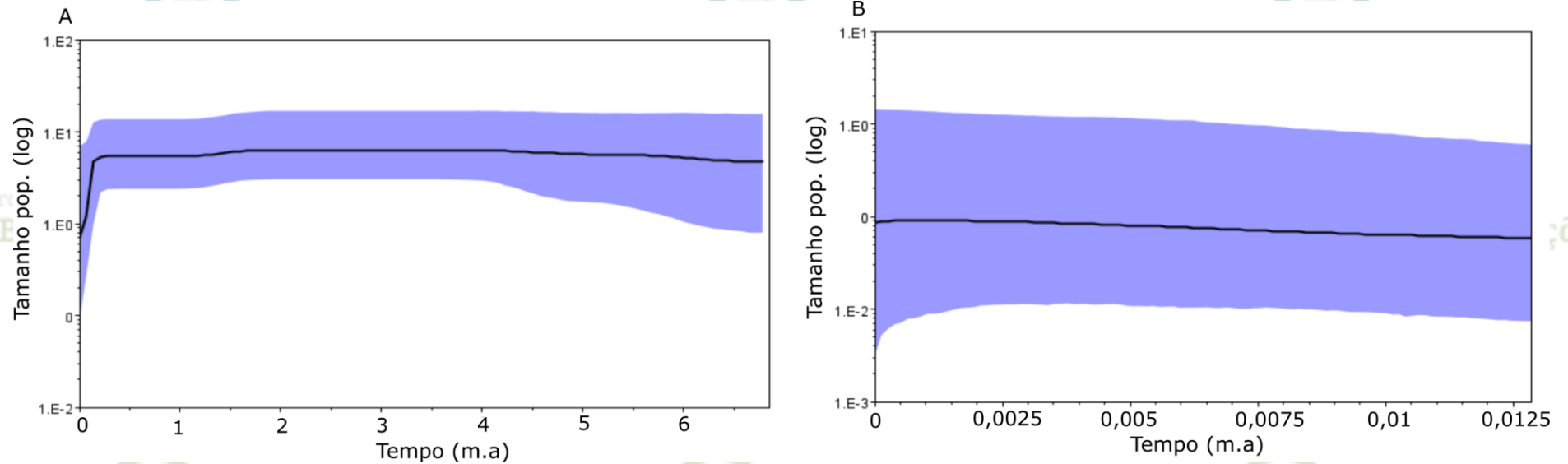


Figura 24. Estimativa de tamanho efetivo (NE) histórico pela análise de *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) para *M. ancylodon* (A) e *M. atricauda* (B). A linha em preto representa a mediana da estimativa e a área em roxo indica os limites superiores e inferiores de 95% de HDP (*Highest Posterior Density*).

6. DISCUSSÃO

As análises de distância, NJ, ML e BI com os marcadores mitocondriais (Tabelas 5 a 7; Fig. 10 a 12) evidenciaram a formação de dois grupos, um para *M. ancyledon* e outro para *M. atricauda*. O mesmo padrão foi mostrado por Santos *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2006), quando *M. ancyledon* era considerada uma única espécie do gênero amplamente distribuída para o litoral brasileiro. Corroborando essa evidência, as análises de estruturação populacional por rede de haplótipo, BAPS, SAMOVA e F_{ST} par-a-par considerando as duas espécies em conjunto também evidenciaram a separação clara entre *M. ancyledon* e *M. atricauda* (Fig. 20 a 22; Tabelas 12 a 17). De fato, revisões taxonômicas posteriores revalidaram o clado subtropical (Sul e Sudeste do Brasil) como *M. atricauda*, permanecendo o nome *M. ancyledon* para o Norte e Nordeste (Carvalho-Filho *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2012). A partir dessa reclassificação, Carvalho *et al.* (2010) propuseram a ocorrência de *M. ancyledon* da Venezuela ao estado brasileiro da Bahia (Nordeste) enquanto a distribuição de *M. atricauda* seria do estado brasileiro do Espírito Santo (Sudeste) à Argentina. Esse limite de distribuição entre a Bahia e o Espírito Santo também foi sugerido anteriormente por Santos *et al.* (2006), propondo isolamento por alopatria entre as espécies.

Porém, é importante ressaltar que possíveis áreas de ocorrência de *Macrodon* entre os limites da distribuição de cada espécie do litoral brasileiro permanecem não estudadas. A região do sul da Bahia até o Espírito Santo (cerca de 800 km), assumida como região limítrofe da distribuição de *M. ancyledon* e *M. atricauda*, respectivamente, é caracterizada por vários ambientes estuarinos com lacunas de dados sobre essas espécies. Consequentemente, possíveis áreas de contato não foram detectadas em trabalhos prévios (Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2013). Diferentemente, a amostragem refinada do presente trabalho permitiu identificar populações simpátricas de *M. ancyledon* e *M. atricauda* simultaneamente no estuário de Mucuri, extremo sul da Bahia, e Conceição da Barra, norte do Espírito Santo (Fig. 15). Dessa forma, foi identificada uma zona de contato de cerca de 60 km (distância entre os dois estuários) para as espécies de *Macrodon* do litoral brasileiro. Isto pode ser evidenciado pelas inferências de NJ, ML e BI com os marcadores mitocondriais (Fig. 10 a 12), demonstrando que partes dos espécimes de *Macrodon* do estuário do Rio Mucuri (considerado *M. ancyledon*) e de Conceição da Barra (*M. atricauda*) agrupam nos clados de *M. ancyledon* e *M. atricauda* com alta confiabilidade. Adicionalmente, destaca-se que a distância encontrada entre os espécimes de cada espécie nas regiões de simpatria são compatíveis com as observadas entre populações alopátricas (Tabelas 5 a 7).

A zona de contato relativamente estreita entre *M. ancylodon* e *M. atricauda* levanta importantes questões biogeográficas sobre quais eventos explicariam a divergência e distribuição desses táxons na costa brasileira. Para isso, foi construída uma árvore filogenética calibrada com os genes mitocondriais concatenados, a qual estimou a separação entre *M. ancylodon* e *M. atricauda* há 1,5 milhões de anos atrás, no início de Pleistoceno (Fig. 16). Similarmente, estudos moleculares em *Bagre bagre* (Siluriformes, Ariidae) também apontaram divergência significativa entre linhagens da costa nordeste e sudeste do Brasil datada em 1,7 milhões de anos, sugerindo a presença de espécies crípticas (Silva *et al.*, 2016). A estimativa de vicariância simultânea entre táxons não relacionados como bagres e pescadas entre o extremo sul da Bahia e o norte do Espírito Santo reforça a inferência de um evento biogeográfico importante para diversificação de peixes costeiros do Atlântico Ocidental.

Com efeito, esse período estimado para a separação de *M. atricauda* e *M. ancylodon* no Pleistoceno é caracterizado por ciclos de expansão e recuo do nível do mar nos períodos glaciais e interglaciais, respectivamente, devido a eventos eustáticos (Brown & Lomolio, 2006). Admite-se que esses eventos de regressão e transgressão marinha influenciam nos padrões de dispersão e especiação de táxons dependentes da plataforma continental e estuarinos (Chakona *et al.*, 2013; Thomaz *et al.*, 2015; Baggio *et al.*, 2017). Logo, as glaciações no Pleistoceno podem ter proporcionado a vicariância das populações de *Macrodon* do Atlântico Sul Ocidental entre o nordeste e sudeste do Brasil a partir da exposição da Plataforma continental nessa região. Nessa região, o banco de Abrolhos no extremo sul da Bahia determina um aumento da largura da Plataforma continental (cerca de 200 km) até o norte do Espírito Santo onde se inicia a cadeia de montanhas submersas Vitória-Trindade, coincidindo com as áreas de contato identificadas nesse trabalho (Fig. 6). Possivelmente, durante a regressão marinha no Pleistoceno, o banco de Abrolhos e a cadeia Vitória-Trindade podem ter constituído uma barreira física para a separação de *Macrodon* da região nordeste e sudeste do Brasil. Inferências similares foram propostas para outros grupos de peixes como *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) por Pereira *et al.* (2012) e *Menticirrhus americanus* (Scianidae) por Freitas *et al.* (2017).

Análises comparativas reforçam a divergência recente entre *M. ancylodon* e *M. atricauda* uma vez que a origem dos Sciaenidae remonta ao Jurássico tardio e início do Cretáceo, há 208 milhões de anos atrás, e com a divergência entre *M. ancylodon* e *M. mordax* (espécie da costa do Pacífico da América do Sul) no Neogeno, há 25 milhões de anos atrás (Xu *et al.*, 2014). Adicionalmente, a homogeneidade encontrada entre os marcadores

nucleares, levando à politomia nas árvores filogenéticas com base nos genes TMO-4C4 e RHO (Fig. 13 e 14) reforçam o pouco tempo de divergência entre *M. ancylodon* e *M. atricauda*, pois os genes nucleares apresentam taxas evolutivas mais lentas que sequências mitocondriais (Collins *et al.*, 2012; Behrens-Chapuis *et al.*, 2015). Do mesmo modo, o padrão de rede de haplótipo em forma de estrela (Fig. 20), com vários haplótipos de DNA mitocondrial originados a partir de um haplótipo mais abundante e amplamente distribuído, conforme descrito nesse trabalho também constitui indícios de diversificação recente (Chakona *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Baggio *et al.*, 2017).

Contrariando estudos prévios (Santos *et al.*, 2006; Carvalho-Filho *et al.*, 2010), as barreiras históricas físicas (banco de Abrolhos e cadeia Vitória-Trindade) e/ou ecológicas (e.g. diferenças na temperatura entre norte/nordeste e sudeste/sul do Brasil) inferidas para a especiação de *Macrodon* do Atlântico Sul Ocidental não representam fatores limitantes à dispersão atual, pois encontramos populações simpátricas de *M. ancylodon* e *M. atricauda*. Essas populações foram detectadas justamente na região da plataforma de Abrolhos e ao norte da cadeia da Vitória-Trindade, assumida como os limites de distribuição de cada espécie, demonstrando assim que essas espécies foram capazes de sobrepor essas barreiras após a especiação e estabelecerem contato secundário.

Os dados moleculares baseados em marcadores mitocondriais também evidenciaram baixa diversidade de nucleotídeo e alta diversidade haplotípica para *M. ancylodon* e *M. atricauda* (Tabelas 8 a 10). Essas características representam sinais de expansão populacional recente após evento de gargalo ou deriva genética, assim como proposto por Santos *et al.* (2006) e Rodrigues *et al.* (2013). Corroborando essa hipótese, eventos de expansão recente para *M. ancylodon* e *M. atricauda* foram indicados na árvore filogenética calibrada (Fig. 16). Novamente, esse padrão sugere a ocorrência de subdivisão de populações ancestrais durante as mudanças climáticas do Pleistoceno, seguida por adaptações locais e posterior expansão populacional após o evento recente de cladogênese.

Curiosamente, a diversidade genética populacional foi maior para *M. atricauda* do que para *M. ancylodon* (Fig. 17 e 18). Esse resultado contraria a proposta de pulso de táxons em espécies estuarinas (Erwin, 1979, 1981), o qual prevê que populações em regiões de plataforma estreita como a costa nordeste do Brasil (tipicamente ocupada por *M. ancylodon*) teriam maior acúmulo de divergência genética interpopulacional pelo forte isolamento em períodos glaciais. Essa hipótese foi confirmada em espécies de peixes estuarino-residentes como *Atherinella brasiliensis* (Baggio *et al.*, 2017) e *Menticirrhus americanus* (Freitas *et al.*,

2017). Entretanto, as espécies do gênero *Macrodon* do Atlântico Sul são estuarina-dependentes, podendo manter padrões de expansão entre estuários próximos, tal como observado na espécie anádroma *Bagre bagre* do Atlântico Sul Ocidental (Silva *et al.*, 2016).

Analisando conjuntamente nossos dados e os publicados por Santos *et al.* (2006) para o marcador mitocondrial CYT-B, observamos maior diversidade genética nas populações de *M. ancylodon* provenientes de Pernambuco, Pará e Amapá enquanto as populações (=localidades) de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram as mais diversas para *M. atricauda* (Fig. 19). Porém, quando consideramos somente as amostrados do presente trabalho com todos os genes mitocondriais, a população de Macaé-RJ para *M. atricauda* foi a que apresentou a maior diversidade genética (Tabelas 8 a 10). Para *M. ancylodon*, a amostragem foi restrita ao sul da Bahia com grandes diferenças no tamanho da amostra o que pode causar viés às estimativas de diversidade genética intrapopulacional. De qualquer modo, os dados aqui apresentados e os previamente publicados (Santos *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2013) apontam que a maior variação genética encontra-se distribuída preferencialmente nas populações geograficamente distantes da área de simpatria, conforme bem ilustrado na Fig. 19. Esses dados oferecem suporte adicional à proposta de dispersão recente das duas espécies em direção à zona de contato entre o extremo sul da Bahia e Espírito Santo.

Os três grupos recuperados pela SAMOVA com os marcadores mitocondriais (Fig. 21; Tabelas 15 a 17) não foram recuperados pela Análise Bayesiana de Estruturação Populacional (BAPS), o qual discriminou apenas *M. ancylodon* de *M. atricauda* (Fig. 22). Essa discrepância com a formação de um terceiro grupo pela SAMOVA se deve à presença das duas espécies (*M. ancylodon* + *M. atricauda*) na região de Mucuri/BA e Conceição da Barra/ES, resultando em níveis enviesados de diversidade genética nessa localidade.

Por outro lado, enquanto a SAMOVA indicou valores baixos e não significativos de estruturação populacional entre as localidades (Fig. 21; Tabelas 15 a 17), a BAPS revelou heterogeneidade entre as populações para *M. ancylodon* e *M. atricauda* individualmente (Fig. 22). Resultados similares foram encontrados por Rodrigues *et al.* (2013) entre populações de *M. atricauda* ao longo do sudeste do Brasil até Argentina. Deve-se ressaltar que a estruturação genética para os clados de *M. ancylodon* e *M. atricauda*, ainda que reduzida, não foi correlacionada com a distância geográfica pelo teste de Mantel, como também demonstrado por Santos *et al.* (2003, 2006). Isso mostra que outros fatores além da distância geográfica influenciam na diversidade genética encontrada entre populações de ambas as espécies apesar da tendência proposta para espécies estuarinas, particularmente as residentes,

de isolamento por distância (Silva *et al.*, 2016; Baggio *et al.*, 2017; Freitas *et al.*, 2017; Sales *et al.*, 2017). Considerando a extensão da costa brasileira e as diferenças ambientais (padrões peculiares de correntes marítimas, variação de temperatura, salinidade e aporte de água doce entre outros) entre as regiões norte, nordeste, sudeste e sul, a heterogeneidade genética das espécies pode estar mais relacionada às particularidades regionais (Cunha & Guerra 2003).

Do ponto de vista histórico, sinais de expansão populacional para *M. ancylodon* e *M. atricauda* foram observados no Holoceno, após os eventos de glaciação no Pleistoceno (Fig. 16). Porém, os testes de neutralidade mostraram expansão significativa apenas para *M. ancylodon* com os três marcadores mitocondriais pelo teste F_s de Fu (Fu, 1997) e com o COI pelo teste D de Tajima (Tajima, 1989) (Tabelas 8 a 10). Em *M. atricauda*, somente o CYT-B apresentou sinal de expansão apenas para o marcador CYT-B. Esse padrão é um pouco diferente ao mostrado na literatura para espécies estuarinas residentes do Atlântico Sul Ocidental, cuja expansão populacional é evidenciada nos períodos glaciais (Pereira *et al.*, 2012; Baggio *et al.*, 2017). Essa diferenciação em *M. ancylodon* e *M. atricauda* pode ser atribuída ao fato de ambas serem estuarina-dependentes (Barletta-Bergan *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2012), com capacidade de expansão populacional após eventos de glaciação uma vez que seriam capazes de dispersar durante a transgressão marinha ao longo da costa entre as áreas estuarinas.

Seguindo esse padrão, a estimativa do tamanho efetivo populacional (NE) ao longo do tempo com base nos marcadores mitocondriais pelo EBSP não evidenciou expansão populacional para *M. atricauda*, sugerindo valores estáveis de NE de 12.550 anos atrás até a atualidade (Fig. 24A). O período amostrado é muito próximo da última glaciação, há 18.000 mil anos atrás, no final do Pleistoceno (Brown & Lomolio, 2006). Como a estimativa de divergência dessa espécie com *M. ancylodon* foi datada há 1,5 milhões de anos atrás, podemos inferir que esse período foi fundamental para a seleção adaptativa de *M. atricauda* no sudeste e sul do Atlântico Sul Ocidental.

M. ancylodon também mostrou baixa expansão populacional nos últimos seis milhões de anos pela análise EBSP, seguida por redução populacional nos últimos 150 mil anos (Fig. 24B). A causa dessa redução populacional permanece obscura, mas pode ser ocasionada por fatores como a endogamia em função de mudanças climáticas e/ou sobrepesca. Porém, embora as populações de *M. atricauda* sofram efeitos negativos da pesca (Cardoso & Haimovici, 2015), estudos de estatística pesqueira em populações e espécies na região norte e nordeste da costa brasileira são ainda escassos. Logo, se faz necessário políticas

de conservação para *M. ancylo don* assim como para *M. atricauda*, os quais devem considerar as particularidades genéticas das populações e os novos padrões de distribuição apresentados nesse estudo.

6. CONCLUSÕES

- As análises com marcadores mitocondriais permitiram separar com confiabilidade as espécies de *Macrodon ancylo don* e *M. atricauda* do litoral brasileiro.
- A amostragem desse trabalho revelou zona de contato entre *Macrodon ancylo don* e *M. atricauda* na região limítrofe da costa nordeste e sudeste do Brasil (estuários do Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES).
- As análises de distância e filogenéticas por ML e BI recuperaram o monofiletismo de *Macrodon ancylo don* e *M. atricauda* com altos valores de suporte de *bootstrap* (>98%) e probabilidade *a posteriori* (> 0,98), além de confirmar a presença dessas espécies em Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES em ambos os clados, constituindo mais uma evidência de simpatria.
- Estima-se que o tempo de divergência entre *Macrodon ancylo don* e *M. atricauda* tenha ocorrido no Pleistoceno, há 1,5 milhões de anos atrás, provavelmente em decorrência da separação física por barreira geográfica como o banco de Abrolhos e a cadeia de montanhas Vitória-Trindade durante a glaciação seguida por posterior contato secundário com a elevação do nível do mar.
- A baixa diversidade de nucleotídeo e alta diversidade de haplótipo no DNA mitocondrial bem como a ausência de diferenças nos marcadores nucleares em *Macrodon ancylo don* e *M. atricauda* são evidências de expansão recente após deriva genética ou efeito gargalo, compatíveis com o isolamento no Pleistoceno e expansão ecológica posterior.
- A diversidade genética ao longo da costa brasileira para ambas as espécies não é homogênea, sugerindo restrições ao fluxo gênico que, no entanto, não podem ser associadas à distância geográfica. Sugere-se que condições ambientais particulares de cada região possam ter influência nessa heterogeneidade da partição genética-espacial.
- Assim como as análises de distância e inferências filogenéticas, a avaliação da estruturação populacional evidenciou a formação de dois grupos claramente distinguíveis, um para *Macrodon ancylo don* e outro para *M. atricauda*, mesmo nas regiões de simpatria (Mucuri/BA e Conceição da Barra/ES);


- Não observamos hibridação entre *Macrodon ancylodon* e *M. atricauda* com os marcadores mitocondriais. Porém, a homogeneidade dos genes nucleares aqui analisados deixa dúvidas sobre a eventual ocorrência de cruzamentos interespecíficos, necessitando de futuras análises para avaliar a hipótese de hibridação com ou sem introgressão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; ARNTZEN, J.W.; BAIRD, S.J.E.; BIERNE, N.; BOUGHMAN, J.; BRELSFORD, A.; BUERKLE, C.A.; BUGGS, R.; BUTLIN, R.K.; DIECKMANN, U.; EROUKHMANOFF, F.; GRILL, A.; CAHAN, S.H.; HERMANSEN, J. S.; HEWITT, G.; HUDSON, A.G.; JIGGINS, C.; JONES, J.; KELLER, B.; MARCZEWSKI, T.; MALLET, J.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, P.; MOST, M.; MULLEN, S.; NICHOLS, R.; NOLTE, A. W.; PARISOD, C.; PFENNIG, K.; RICE, A. M.; RITCHIE, M.G.; SEIFERT, B.; MADJA, C. M.; STELKENS, R.; SZYMURA, J. M.; VAINOLA, R.; WOLF, J. B. W.; ZINNER, D. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. v. 26, p. 229-246.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Ltd. p. 421-446.
- ARNOLD, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York. 232p.
- BAGGIO, R. A.; MORETTI, C. B.; BIALETZKI, A.; BOEGER, W. A. 2016. Hybrids between *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) previously reported in the Upper Paraná River are likely escapes from aquaculture farms: evidence from microsatellite markers. *ZOOLOGIA*. v. 33, p. 1-6.
- BAGGIO, R. A.; STOIEV, S. B.; SPACH, H. L.; BOEGER, W. A. 2017. Opportunity and taxon pulse: the central influence of coastal geomorphology on genetic diversification and endemism of strict estuarine species. *Journal of Biogeography*. p. 1-14. doi:10.1111/jbi.12934
- BANDEL, H., FORSTER, P., & RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. v. 16, no. 1, p. 37-48.
- BARBOSA, A. J. B.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; SANTOS, S. 2014. Molecular phylogeny of weakfish species of the *Stellifer* Group (Sciaenidae, Perciformes) of the

- Western South Atlantic based on mitochondrial and nuclear data. *Plos One*. v. 9, p. 1-8, e102250.
- BARLETTA-BERGAN, A.; BARLETTA, M.; SAINT-PAUL, U. 2002. Structure and seasonal dynamics of larval fish in the Caeté river estuary in NorthBrazil. *Estuarine, Coastal Shelf Sci*. v. 54, p. 193–206.
- BEHRENS-CHAPUIS, F.; HERDER, F.; ESMAEILI, H. R.; FREYHOF, J.; HAMIDAN, N. A.; ÖZULUĞ, M.; ŠANDA, R.; GEIGER, M. F. 2015. Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies – can this marker help to explain conflicts in cyprinids? *DNA Barcodes*. v. 3, p. 187–199.
- BELLWOOD, D.R.; WAINWRIGHT, P.C. 2002. The history and biogeography of fishes on coral reefs. *Coral reef fishes. Dynamics and diversity on a complex ecosystem* (ed. by P.F. Sale),. Academic Press, New York, NY. p. 5–32
- BETANCUR, R.; ACERO, P. A.; DUQUE-CARO, H.; SANTOS, S. R. 2010. Phylogenetic and Morphologic Analyses of a Coastal Fish Reveals a Marine Biogeographic Break of Terrestrial Origin in the Southern Caribbean. *Plos One*. v. 5. e11566
- BETANCUR, R.; BROUGHTON, R. E.; WILEY, E. O.; CARPENTER, K.; LÓPEZ, J. A.; LI, C.; HOLCROFT, N. I.; ARCILA, D.; SANCIANGCO, M.; CURETON, I.I.; J.C.; ZHANG, F.; BUSER, T.; CAMPBELL, M.A.; BALLESTEROS, J.A.; ROAVARON, A.; WILLIS, S.; BORDEN, W.C; ROWLEY, T.; RENEAU, P.C.; HOUGH, D.J.; LU, G.; GRANDE, T.; ARRATIA, G.; ORTÍ, G. 2013. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *Plos Currents Tree of Life*. Apr 18. Edition 1.
- BRIGGS, J. C.; BOWEN, B. W. 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish Distributions. *Journal of Biogeography*. v. 30, p. 12-30.
- BRIGGS, J.C. 1974. *Marine zoogeography*. McGraw-Hill, New York. p. 475
- BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. 2006. *Biogeografia*. 2° ed. Funpec. p. 177-190.
- CARDOSO, L. G.; HAIMOVICI, M. 2015. Long-term changes in the age structure, mortality and biomass of the king weakfish *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) in southern Brazil: Is it resilient enough to avoid collapse? *Fisheries Research*. v. 167, p. 174–179.
- CARDOSO, L. G.; SANTOS, S.; HAIMOVICI, M. 2012. Differences in the otoliths support the distinction of the genus *Macrodon* into two species in the south-western Atlantic Ocean. *Marine Biodiversity Records*. v.5, p. 1-4.

- CARVALHO-FILHO, A.; SANTOS, S. & SAMPAIO, I. (2010). *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) (Perciformes: Sciaenidae), a valid species from the southwestern Atlantic, with comments on its conservation. *Zootaxa*. v. 2519, p. 48–58.
- CHAKONA, A.; SWARTZ, E.R.; GOUWS, G. 2013. Evolutionary Drivers of Diversification and Distribution of a Southern Temperate Stream Fish Assemblage: Testing the Role of Historical Isolation and Spatial Range Expansion. *Plos One*. v. 8. e70953.
- CHAO, L.N. 1986. A synopsis on zoogeography of the Sciaenidae. In *Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes* (T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi & K. Matsuura, eds). Ichthyological Society of Japan, Tokyo. p.570-589.
- CHU, Y. T.; LO, Y. L.; WU, H. L. 1963. A Study on the Classification of the Sciaenid Fishes of China, with Description of New Genera and Species. Science Technology Press. P. 50-53.
- COLLINS, R. A.; ARMSTRONG, K. F.; MEIER, R.; YI, Y.; BROWN, S. D. J. et al. 2012. Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade. *Plos One*. v.7. e28381.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TAMP J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*. v. 9, p. 539.
- COSTA, T.L.A., PENNINO, M.G., MENDES, L.F. 2017. Identifying ecological barriers in marine environment: The case study of *Dasyatis marianae*, *Marine Environmental Research*. v. 125, p.1-29.
- CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T. 2003. *Geomorfologia do Brasil*. 3ed. Bertrand,. Rio de Janeiro. p. 273 -337.
- DIJKSTRA, P.D.; VERZIJDEN, M. N.; GROOTHUIS, T.G.G.; HOFMANN. H.A. 2012. Divergent hormonal responses to social competition in closely related species of haplochromine cichlid fish. *Hormones and Behavior*. v. 61, p. 518–526.
- DOMINGUES, V. S.; SANTOS, R.S.; BRITO, A.; ALEXANDROU, M.; ALMADA, V.C. 2007. Mitochondrial and nuclear markers reveal isolation by distance and effects of Pleistocene glaciations in the northeastern Atlantic and Mediterranean populations of the white seabream (*Diplodus sargus*, L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v.346, p. 102–113.

- 
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. v.29, p. 1969-1973.
- DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*. v. 11, no.12, p.2571-2581.
- ERSTS, P. J. [Internet]. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed on 2017-6-30.
- ERWIN, T. L. 1979. Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. *Carabid beetles – their evolution, natural history, and classification* (ed. by T.L. Erwin, G.E. Ball and D.R. Whitehead). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands. p. 539–592.
- ERWIN, T. L. 1981. Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. *Vicariance biogeography – a critique* (ed. by G. Nelson and D.E. Rosen). Columbia University Press, New York. p. 159–196.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. v. 1, p. 47-50.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics Society of America*. v. 131, p. 479-491.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. v. 30, p. 783-791.
- FILATOV, D. A.; OSBORNE, O. G.; PAPADOPULOS, A. S. T. 2016. Demographic history of speciation in a *Senecio* altitudinal hybrid zone on Mt. Etna. *Molecular Ecology*. v. 25, p. 2467–2481.
- FLOETE, S.R.; ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; JOYEUX, J. C.; SMITH-VANIZ, W. F.; WIRTZ, P.; EDWARDS, A. J.; BARREIROS, J. P.; FERREIRA, C. E. L.; GASPARINI, J. L.; BRITO, A.; FALCON, J. M.; BOWEN, B. W.; BERNARDI, G.

2008. Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography*. v. 35, p. 22–47.
- FREITAS, A. S.; SILVA, R.; SAMPAIO, I. 2017. SCHNEIDER, H. 2017. The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern king croaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. *Fisheries Research*. v. 191, p. 87–94.
- FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics*. v. 147, p. 915-925.
- FUTUYMA, D. J. 2003. *Biologia Evolutiva*. 2 ed. FUNPEC. 630p.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series*. v. 41, p. 95-98.
- HARRISON, R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary processes. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. v. 7, p. 69–128.
- HENRIQUES, R.; POTTS, W.M.; SANTOS, C.V.; SAUER, W.H.H.; SHAW, P.W. 2014. Population connectivity and phylogeography of a coastal Fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current region: evidence of an ancient vicariant event. *Plos One*. v. 9, no. 2, e87907.
- IVANOVA, N. V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology*. v. 7, no. 4. p. 544-548.
- JENSEN, J. L.; BOHONAK, A. J.; KELLEY, S. T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v. 3. 23. <<http://ibdws.sdsu.edu/>> Acessado 18 de Janeiro de 2017.
- KAHILAINEN, K. K.; ØSTBYE, K.; HARROD, C.; SHIKANO, T.; MALINEN, T.; MERILA, J. 2011. Species introduction promotes hybridization and introgression in *Coregonus*: is there sign of selection against hybrids? *Molecular Ecology*. v. 20, p. 3838–3855.
- KOSMAN, E.T. & LEVITAN, D.R. 2014. Sperm competition and the evolution of gametic compatibility in externally fertilizing taxa. *Molecular Human Reproduction*. v.20, n.12, p. 1190-1197.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. MEGA7. Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger dataset. *Molecular Biology and Evolution*. v. 33, p. 1870-1874.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNAPolymorphism data. *Bioinformatics*. v. 25, p. 1451-1452.

LUIZ, O. J.; MADIN, J. S.; ROBERTSON, D. R.; ROCHA, L. A.; WIRTZ, P.; FLOETER, S. R. 2012. Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal

barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. *The Royal Society*. v. 279, p. 1-8

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res*. v. 27, p. 209 -220.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA. p. 1 - 8.

MILOSLAVIC, H. P.; KLEIN, B.; DÍA, Z. J. M.; HERNÁNDEZ, C. E.; BIGATTI, G.; CAMPOS, L.; ARTIGAS, F.; CASTILLO, J.; PENCHASZADEH, P. E.; NEILL, P. E.; CARRANZA, A.; RETANA, M. V.; ASTARLOA, J. M. D.; LEWIS, M.; YORIO, P.; PIRIZ, M.L.; RODRÍGUEZ, D.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; GAMBOA, L.; MARTÍN, A. 2011. Marine Biodiversity in the Atlantic and Pacific Coasts of South America: Knowledge and Gaps. *Plos One*. v.6, e14631.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Bahia – Municípios da zona costeira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/gestao-territorial/gerenciamento-costeiro/gerenciamento-costeiro-nos-estados-gerco/item/10598>>. Acessado em 24 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Unidade de conservação e mosaico. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha/unidades-de-conservacao-e-mosaicos>>. Acessado 18 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Bahia. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/se/pnma/ecos15.html>>. Acessado em 24 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Espírito Santo – Municípios da zona costeira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/gestao-territorial/gerenciamento-costeiro/gerenciamento-costeiro-nos-estados-gerco/item/10605>>. Acesso em 23 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Espírito Santo. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/se/pnma/ecos16.html>>. Acesso em 24 de Janeiro de 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Limites da Zona Costeira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/gestao-territorial/gerenciamento-costeiro/a-zona-costeira-e-seus-m%C3%BAltiplos-usos/caracteristicas-da-zona-costeira>>. Acesso em 18 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/205/_publicacao/205_publicacao03022011100749.pdf>. Acesso em 23 de Janeiro de 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Zona costeira e marinha. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha>> . Acesso em 18 de Janeiro de 2017.

MONTANARI, S. R.; HERWERDEN, L. V.; PRATCHETT, M. S.; HOBBS. J. P. A.; FUGEDI, A. 2011. Reef fish hybridization: lessons learnt from butterflyfishes (genus *Chaetodon*). Ecology and Evolution. v. 2, p. 310-328.

MUHLFELD, C. C.; KOVACH, R. P.; JONES. L. A.; AL-CHOKHACHY, R.; BOYER, M.C.; LEARY, R. F.; LOWE, W. H.; LUIKART, G.; ALLENDORF, F. W. 2014. Invasive hybridization in a threatened species is accelerated by climate change. Nature climate change. v.4, p. 620-624.

NEI, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press New York. p.428-429.

NELSON, J, S.; GRANDE,T.C.; WILSON, M.V.H. 2015. Fishes of the World. 5ed. John Wiley and Sons, Inc, New York. p. 600.

PALUMBI, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, editors. Molecular Systematics. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. p. 205–247.

PASSOS, A. C.; CONTENTE, R. F.; ARAUJO, C. C. V.; DAROS, F. A. L. M.; SPACH, H. L.; ABILHO, V.; FÁVARO, L. F. 2012. Fishes of Paranagua´ Estuarine Complex, South West Atlantic. Biota Neotropica. v. 12, p. 226–38.

PEREIRA, T, L.; SANTOS, U.; SCHAEFER, C. E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. 2012. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. Journal of Biogeography. P. 1-10. doi:10.1111/jbi.12044.

- PITTMAN, W.C.; CANDE, S.; LABRECQUE, J; PINDELL, J. 1993 Fragmentation of Gondwana: the separation of Africa from South America. Biological relationships between Africa and South America (ed. by P. Goldblatt). Yale University Press, New Haven. p. 15–34
- POSADA, D. 2003. In press. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution. Guindon S and Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". Systematic Biology. v. 52, p. 696-704.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; DRUMMOND, A. J. 2014. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed on 2017-6-30.
- RAMOS-ONSINS, R.; ROZAS, R. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular Biology and Evolution. v. 19, p. 2092–2100.
- RIDLEY, M. 2008. Evolução. 3ed. 752p.
- ROBERTS, D. G.; GRAY, C. A.; WEST, R. J.; AYRE, D. J. 2009. Evolutionary impacts of hybridization and interspecific gene flow on an obligate estuarine fish. . Journal of Evolutionary Biology . v. 22, p. 27–35.
- ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; ROMAN, J.; BOWEN, B. W. 2005. Ecological speciation in tropical reef fishes. Proceedings of the Royal Society. v. 272, p. 573-579.
- RODRIGUES, R.; SANTOS, S.; HAIMOVICI, M.; SAINT-PAUL, U.; SAMPAIO, I. & SCHNEIDER, H. (2013) Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): a study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. Mitochondrial DNA. v. 7, p. 1–7.
- SALES, J. B. L.; RODRIGUES-FILHO, L. F. S.; FERREIRA, Y. S.; CARNEIRO, J.; ASP, N. E.; SHAW, P. W.; HAIMOVICI, M.; MARKAIDA, U.; READY, J.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. 2017. Divergence of cryptic species of *Doryteuthis plei* Blainville, 1823 (Loliginidae, Cephalopoda) in the Western Atlantic Ocean is associated with the formation of the Caribbean Sea. Molecular Phylogenetics and Evolution. v. 106, p. 44-54.
- SANGER, F.; NICHLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. v. 74, p. 5463-5468.

- SANTOS, S.; GOMES, M. F.; FERREIRA, A. R. S.; SAMPAIO, I. & SCHNEIDER, H. (2013). Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 66, p. 423–428.
- SANTOS, S.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal Waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology*. v.15, p. 4361-4373.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER H. & SAMPAIO, I. (2003). Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*. v. 26, no 2, p. 151-161.
- SASAKI, K., 1989. Phylogeny of the family Sciaenidae, with notes on its zoogeography (Teleostei: Perciformes). *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* v. 36, p. 1–137.
- SEEHAUSEN, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology and Evolution*. V. 19, no. 4, p. 198-207.
- SEVILLA, R.G.; DIEZ, A.; NORÉN, M.; MOUCHEL, O.; JÉRÔME, M.; VERREZ-BAGNI, V.; PELT, H. V.; FAVRE-KREY, L. & KREY, G.; CONSORTIUM F, BAUTISTA, J. M. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome *b* and nuclear rhodopsin genes. *Mol Ecol Notes*. v. 7, p. 730–734.
- SHAW, P. W.; ARKHIPKIN, A. I.; AL-KHAIRULLA, H. 2004. Genetic structuring of Patagonian toothfish populations in the Southwest Atlantic Ocean: the effect of the Antarctic Polar Front and deep-water troughs as barriers to genetic exchange. *Molecular Ecology*. v. 13, p. 3293–3303.
- SILVA, W. C.; MARCENIUK, A. P.; SALES, J. B. L.; ARARIPE, J. 2016. Early Pleistocene lineages of *Bagre bagre* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of South America, with insights into the demography and biogeography of the species. *Neotropical Ichthyology*. v. 14, e150184.
- SMITH, K. L.; HALE, J. M.; KEARNEY, M. R.; AUSTIN, J. J.; MELVILLE, J. 2013. Molecular patterns of introgression in a classic hybrid zone between the Australian tree frogs, *Litoria ewingii* and *L. paraewingii*: evidence of a tension zone. *Molecular Ecology*. v. 22, p. 1869–1883.

- STEEVES, T.E.; ANDERSON, D. J.; FRIESEN, V. L.; 2005. The isthmus of panama: a major physical barrier to gene flow in a highly mobile pantropical seabird. *Journal of Evolutionary Biology*. v. 18, p. 1000-1008.
- STREELMAN, J.T.; KARL, S.A. 1997. Reconstructing labroid evolution with single-copy nuclear DNA. *Royal Society B: Biological Sciences* are provided here courtesy of. The Royal Society. v. 264, p. 1011–1020.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. v. 123, p. 585-595.
- THOMAZ, A. T.; MALABARBA, L. R.; BONATTO, S. L.; KNOWLES, L. L. 2015. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*. v. 42, p. 2389–2401.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. A .D. & GIBSON, T. J. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* v. 22, p. 4673- 4680.
- VONLANTHEN, P.; BITTNER, D.; HUDSON, A. G.; YOUNG, K. A.; MULLER, R.; LUNDSGAARD-HANSEN, B.; ROY, D.; DI PIAZZA, S.; LARGIADER, C.R.; SEEHAUSEN, O. 2012. Eutrophication causes speciation reversal in whitefish adaptive radiations. v. 482, p. 347- 363.
- WEIR, B. S.; COCKERHA, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. v. 38, p. 1358-1370.
- WILLIAMS, T.H.; MENDELSOM, T. C. 2011. Female preference for male coloration may explain behavioural isolation in sympatric darters. *Animal Behaviour*. v. 82, p. 683-689.
- XU, T.; TANG, D.; CHENG, Y.; WANG, R. 2014. Mitogenomic perspectives into sciaenid fishes' phylogeny and evolution origin in the New World. *Gene*. v. 539, p. 91–98.
- YAAKUB, S.M.; BELLWOOD, D. R.; HERWERDEM, L.V.; WALSH. F. M.; 2006. Hybridization in coral reef fishes: Introgression and bi-directional gene exchange in *Thalassoma* (family Labridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 40, p. 84-100.