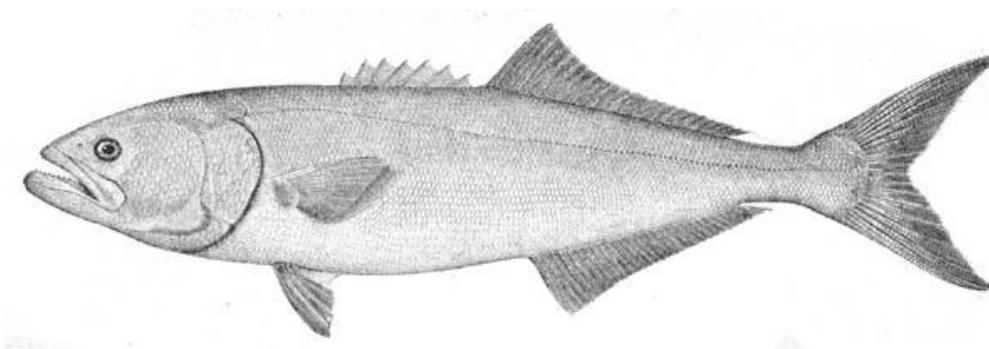


Universidade Federal do Rio de Janeiro

Genética pesqueira e filogeografia da Anchoa,
Pomatomus saltatrix (Linnaeus, 1766)

Livia Bonetti Villela



Genética Pesqueira e Filogeografia da Anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766)

Livia Bonetti Villela

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientador: Antonio Mateo Sole-Cava

Co-orientador: Pedro Hollanda Carvalho

Rio de Janeiro
Outubro de 2015

Genética Pesqueira e Filogeografia da Anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766)

Orientador: Antonio Mateo Sole-Cava

Co-orientador: Pedro Hollanda Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Aprovada por:

Dra. Michelle Regina Lemos Klautau (UFRJ)

Dr. Paulo Cesar de Paiva (UFRJ)

Dr. Paulo Alberto Silva da Costa (Unirio)

Dr. Rodrigo Leão de Moura (UFRJ) - Suplente

Dra. Carla Zilberberg (UFRJ) - Suplente

Rio de Janeiro
Outubro de 2015

Bonetti, Livia Villela

Genética pesqueira e filogeografia da anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766)/ Livia Bonetti Villela – Rio de Janeiro: UFRJ/IB, 2015

Paginas 110

Orientador: Antonio Mateo Sole Cava

Co-orientador: Pedro Hollanda Carvalho

Dissertação: Mestrado – UFRJ/ Instituto de Biologia/Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2015.

Referencias bibliográficas: f.112

1. Anchova. 2. Estruturação populacional. 3. Pesca. 4. Estoques pesqueiros. 5. ESU
I. Bonetti, Livia Villela. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. III. Genética pesqueira e filogeografia da anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766).

Resumo

Genética pesqueira e filogeografia da anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766).

Livia Bonetti Villela

Orientador: Antonio Mateo Sole-Cava

Co-Orientador: Pedro Hollanda Carvalho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

A anchova (*Pomatomus saltatrix*) é uma espécie pelágica e costeira, com migrações sazonais e distribuição tropical e subtropical. Devido à sua grande importância comercial, a espécie encontra-se atualmente sobre-explorada. Assim, a delimitação de seus estoques pesqueiros é fundamental. Para as anchovas, foram observadas populações isoladas geograficamente em uma escala global. No litoral do Brasil, algumas inferências sugerem que a reprodução ocorra em dois locais distintos ao longo da sua distribuição, o que poderia levar a uma segregação dos estoques. Diferenças genéticas já foram observadas entre duas localidades da costa do Brasil. No presente trabalho, buscamos inferir a estrutura populacional da espécie localmente, e também testar a hipótese de variação sazonal do limite latitudinal entre as populações no litoral de São Paulo. Marcadores mitocondriais e nucleares foram empregados para realizar tanto abordagens clássicas de genética de populações: índice de estruturação F_{ST} e Análise de Variância Molecular; como abordagens filogeográficas: redes de haplótipos, inferências filogenéticas e análise Bayesiana de atribuição. Os resultados obtidos pelos marcadores foram comparados por tabelas de contingência. Essas abordagens demonstraram a presença de duas linhagens com divergência profunda na costa do Brasil, apresentando uma segregação geográfica, uma mais ao norte e outra mais ao sul da distribuição, sendo o litoral de São Paulo uma região de transição. Essa segregação parece estar correlacionada com fatores históricos e condições oceanográficas. As divergências ecológicas, associadas as divergências genéticas, possibilitam a classificação como Unidades Evolutivamente Significantes, tendo relevância direta para o manejo dessa espécie no Brasil.

Palavras-chave: estruturação populacional, pesca, estoques pesqueiros, ESU.

Abstract

Fishery genetics and phylogeography of Bluefish, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766).
Livia Bonetti Villela

Orientador: Antonio Mateo Sole-Cava
Co-Orientador: Pedro Hollanda Carvalho

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

The bluefish (*Pomatomus saltatrix*) is a coastal pelagic species with seasonal migration and tropical and subtropical distribution. Due to its great commercial importance, the species is currently overfished. Thus, the delimitation of its fisheries stocks is fundamental. Geographically isolated populations of bluefish in a global scale have been reported. In the Brazilian coast, some inferences suggest the occurrence of two different reproduction areas, which could lead to segregation of stocks. Preliminary results showed genetic differences among bluefish from different locations along the Brazilian coast. The present study infers the local genetic structure of bluefish populations, and tests the hypothesis of seasonal variation of the latitudinal limits among the populations in the coast of São Paulo state. Mitochondrial and nuclear molecular markers were used in classical population structure analyses: F_{ST} e AMOVA; and in phylogeographical analyses: haplotype networks, phylogenetic inferences and Bayesian Analysis of Attribution. The results among different molecular markers were compared through contingency tables. All analyses converge into detecting two deeply divergent lineages of bluefish in the Brazilian coast: one in the Southwest and the other in the South of Brazil. The coast of São Paulo acts as a transition zone between these two lineages. This segregation appears to be related with historical events and current oceanographic conditions. The ecological differences observed allow a classification of anchovies also as Evolutionarily Significant Units, having direct relevance to the management of the species in Brazil.

Kew-words: population structure, stock, fishery, ESU.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao meu orientador Sole, pelos ensinamentos não só acadêmicos de extrema valia para minha carreira profissional, mas também para a vida. Pelo tempo e dedicação a este trabalho e pela confiança.

Ao meu co-orientador Pedro, pelo grande suporte a este trabalho que tornou tudo possível, pela paciência, pelo incentivo, dedicação, e convivência por todo esse tempo.

À Ghennie, pelas incansáveis discussões, pela companhia nos dias mais longos e infinita ajuda com as análises. E também ao Anderson e à Carol, que contribuíram diversas vezes com esse trabalho.

A todos que contribuíram com as coletas: Pedro, por diversas das amostragens, Equipe de Campo GEP - Univale, Thomas M. Grothues, colaborador que enviou as amostras dos EUA, Natalia Cavaleiro, Elisa, Livia Peluso, Raquel Renó, e ao meu pai e Marcelo, que me levaram para realizar as amostragens sazonais em Cananéia.

Aos técnicos do laboratório Itamar e Nury, que todos os dias facilitam nosso trabalho com tanta competência.

A CAPES que concedeu a bolsa de Mestrado para que eu desenvolvesse o presente trabalho. E ao projeto Rede de Identificação Molecular do Pescado que financiou grande parte desta pesquisa.

À Elisa, companheira de aventuras, de pós-graduação, sem a qual as viagens desse período não teriam sido as mesmas.

Aos queridos amigos que conheci no LBDM, que tornaram a vida longe de casa uma segunda casa: Ghennie, Elisa, Carol, Pedro, Anderson, Nathália e Luisa.

A todos os outros membros do LBDM, externos e de outros laboratórios com quem tive o prazer de conviver todos esses anos: Teresa, Cris, Haydée, Júlia, Isabela, Izabela, Weidy, Angela, Joice, Nury, Itamar, Sônia, Serginho, Bianca, Luana, Carol Ribas e Karina.

As grandes amigas que me acolheram e fizeram desses quase oito anos no Rio de Janeiro uma experiência incrível: Ciça, Clara, Cynthia, Carol Saad, Lilian, Viviane, Verônica, Renata, Lara, Malu.

Ao meu companheiro Marcelo, que sempre me apoiou, incentivou, admirou e acreditou em mim e nas minhas capacidades. Por tanto carinho e amor e companheirismo todos esses anos.

Em especial aos meus pais, que acreditaram no meu sonho e me deram suporte, com muito amor e incentivo. Por me ajudarem nas coletas e por compartilharem comigo o interesse pelas anchovas.

Esse trabalho só foi realizado devido o apoio e colaboração de vocês. Obrigada!

Sumário

1	Introdução.....	9
1.1	Conectividade no Ambiente Marinho.....	11
1.2	A anchova, <i>Pomatomus saltatrix</i> (Linnaeus, 1766)	11
1.2.1	Biologia.....	11
1.2.2	Aspectos da espécie na costa do Brasil e America do Sul.....	14
1.2.3	Pesca.....	16
1.2.4	Ecologia Molecular	18
2	Objetivo	21
2.1	Objetivos específicos:.....	21
3	Material e Métodos.....	21
3.1	Delineamento amostral e obtenção de DNA.....	21
3.2	Análise de sequências de DNA	23
3.2.1	Amplificação e sequenciamento	23
3.2.2	Análise dos dados de sequências.....	25
3.2.3	Análises filogeográficas.....	27
3.2.4	Análises de Estruturação populacional	28
3.3	Microssatélites.....	29
3.3.1	Amplificação e sequenciamento	29
3.3.2	Processamento dos dados e polimorfismo dos marcadores.....	32
3.3.3	Análises de Estruturação populacional	33
3.4	Comparações entre marcadores.....	35
4	Resultados.....	35
4.1	Genes.....	36
4.1.1	Diversidade.....	36
4.1.2	Análises Filogeográficas.....	39
4.1.3	Análises de Estruturação Populacional	48
4.2	Microssatélites.....	53
4.2.2	Estruturação Populacional.....	56

4.2.2.1 Análises de variância inter e intrapopulacional	56
4.2.2.2 Análises Bayesianas de atribuição	59
4.2.3 Comparações entre marcadores.....	65
5 Discussão.....	67
5.1 Diversidade Genética e Análises de Estruturação populacional.....	68
5.2 Variações sazonais das populações.....	74
5.3 Filogeografia	80
5.4 Populações ou espécies?.....	82
5.5 Pesca	84
6 Conclusões e perspectivas futuras.....	85
7 Referências	87
8 Anexos	103

1 Introdução

Completando quase 100 anos desde sua primeira publicação em 1918 (Fisher 1918), a genética de populações vem crescendo cada vez mais e ganhando espaço nas mais diversas áreas. Associada à Teoria da Seleção natural de Darwin na década de 30, como Síntese Evolutiva, a Genética de Populações procura explicar como o polimorfismo das populações naturais é fundamental para o processo evolutivo. As leis de Mendel associadas à biometria eram aplicadas antes mesmo de a molécula de DNA ser descoberta nos anos 50 por Watson e Crick. Muitas das abordagens matemáticas publicadas pelos pioneiros da área (Fisher 1918, Haldane 1924, Wright 1930) são as mesmas dos dias atuais. O ambiente está em constante mudança e a variação é de extrema importância para adaptação das espécies em condições adversas. A variação genética no tempo e espaço das populações está diretamente ligada a aspectos ecológicos, fluxo gênico, sucesso reprodutivo, tamanho populacional e eventos históricos pelos quais as populações passaram.

As primeiras aplicações moleculares inferindo estruturação populacional em peixes foram realizadas nos anos 50, em análises por grupos sanguíneos (Cushing e Durall 1957, Suzuki 1958), mas só foram associados à genética no fim da década de 60 (Ligny 1969). Os métodos utilizados para acessar as variações foram evoluindo junto às abordagens (Utter 1991, Ward e Grewe 1994). A primeira técnica multi-locus usada para estimar a variabilidade genética em peixes foi a eletroforese de isoenzimas (Nevo 1978) Essa abordagem era relativamente barata e produzia dados rapidamente, mas necessitava de material fresco. Outro problema é que, por serem genes constitutivos de proteínas principalmente do metabolismo primário, estavam sujeitas à seleção purificadora. Ainda que a maior parte das substituições pudessem ser efetivamente consideradas seletivamente neutras, as isoenzimas apresentavam uma baixa variabilidade intraespecífica (Ward e Grewe 1994). Outra técnica que apareceu posteriormente verificava diretamente variações do DNA por enzimas de restrição. Estas cortavam as sequências específicas de DNA revelando polimorfismo nos sítios de reconhecimento, entre indivíduos. A molécula mais usada para essas análises, por ser analiticamente mais fácil de estudar, foi o DNA mitocondrial (mtDNA), que até hoje continua a ser amplamente empregado (Avice *et al.* 1997). O DNA mitocondrial proporcionou uma facilidade maior para estimar a variação gênica, podendo aumentar assim o número de indivíduos e

consequentemente a confiabilidade estatística das análises. Com o surgimento da técnica de PCR e das técnicas de sequenciamento, a variação passou a ser acessada diretamente pela sequências de DNA. Novos marcadores vieram a ser utilizados aumentando assim também as abordagens (Sunnucks *et al.* 2000).

Atualmente os marcadores moleculares mais utilizados nas abordagens populacionais de animais são o DNA mitocondrial (Cavalli-Sforza 1998) e microssatélites (Kim e Sappington 2013). Por ser uma molécula de natureza haplóide, herança matrilinear e com rápida taxa de mutação, o DNA mitocondrial vem sendo usado para reconstruir, não só o fluxo gênico atual entre populações, mas também a historia evolutiva dos grupos estudados (Awise *et al.* 1997, Cavalli-Sforza 1998). Além disso, o mtDNA tem sido usado para estudar a ecologia das espécies, como filopatria de fêmeas (Stephien e Faber 1998) e rotas de migração (Templeton 2002). Os microssatélites são de origem nuclear e apresentam herança biparental clássica, como nos modelos mendelianos. Denominadas também como SSR (*Single Sequence Repeats*), são sequências de dois a seis nucleotídeos (*motif*) repetidos diversas vezes. Os microssatélites, em geral, não são regiões codificantes do DNA e apresentam padrões de mutação específicos que conferem um polimorfismo alto a esses marcadores (Kin e Spaginton 2013).

Uma das aplicações importantes da genética de populações é a inferência de estoques pesqueiros dos recursos marinhos (Carvalho e Hauser 1995, Thorpe *et al.* 2000, Ovenden *et al.* 2015). Os estoques pesqueiros possuem diversas definições. Uma delas é que são as unidades independentes de uma espécie com capacidade de se auto sustentar reprodutivamente, ocupando um determinado espaço e tempo. No âmbito da abordagem da genética pesqueira, uma população estruturada pode ser considerada então como abrigando diferentes estoques (Carvalho e Hauser 1995). Os organismos marinhos são considerados como um dos poucos recursos naturais selvagens ainda explorados pelo homem, e nas ultimas décadas diversos estoques vem sendo documentados como entrando em decadência (Jackson *et al.* 2001, Myers e Worm 2003, Pinski *et al.* 2011, Bender *et al.* 2014, Dulvy *et al.* 2014). A sobre exploração de algumas espécies e a degradação antrópica do ambiente marinho podem levar ao colapso das populações locais e globais de uma maneira que não possam se recuperar (Myers *et al.* 1995, Worm *et al.* 2006). No Brasil, os trabalhos de genética que acabam por inferir estoques pesqueiros vêm crescendo, tanto para peixes (Santos *et al.* 2003, 2006, Brigida *et al.* 2007, Silva-Oliveira 2008, Vasconcelos *et al.* 2008,2015, da Silva *et al.* 2015) quanto para moluscos (Lazoski *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2005, Moreira *et al.* 2011) e crustáceos (Gusmão *et al.* 2005, 2006, Voloch e Solé-Cava 2005, Maggioni *et al.* 2003, Rodríguez-Rey *et al.* 2013). A delimitação

de estoques com essa abordagem vem trazendo importantes ferramentas ao manejo pesqueiro.

1.1 Conectividade no Ambiente Marinho

O nível de estruturação em que as populações marinhas se encontram tem sido relacionado com o seu potencial de dispersão no ambiente, tanto de larvas quanto dos adultos (Burton 2009, Bohonak 1999). As larvas são um importante meio de dispersão, principalmente para espécies bentônicas e sésseis. O tempo que estas permanecem na coluna d'água tem sido relacionado em diversos trabalhos ao grau de conectividade em que diferentes populações se encontram (Waples 1998, Doherty 1995, Bohonak 1999). No entanto, alguns outros fatores além do período larval, como condições físicas e químicas e a circulação de correntes influenciam diretamente a capacidade de dispersão (Bohonak 1999, Cowen e Sponaugle 2009).

Para peixes pelágicos, além de o estágio larval, os adultos também podem ser os dispersores. Alguns peixes possuem a capacidade de cruzar oceanos, como alguns tubarões e grandes peixes (Bremer *et al.* 1998, Bonfil *et al.* 2005). No entanto, mesmos esses animais com distribuição em todo o mundo frequentemente apresentam indícios de estruturação populacional. A estruturação nesses casos geralmente é influenciada por aspectos ecológicos das espécies e adaptações locais (Viñas e Bremer 2004, Bonfil *et al.* 2005, Ely *et al.* 2005). Além desses, os eventos históricos demográficos e geológicos são de extrema importância, sendo relacionadas diretamente à distribuição, separação e composição genética das populações (Grant e Bowen 1998, Hey 1991, Hewitt 2006).

1.2 A anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766)

1.2.1 Biologia

A espécie estudada neste trabalho foi descrita por Linnaeus, como *Gasterosteus saltatrix*, em 1766 (Linnaeus 1766). Atualmente é classificada dentro da família Pomatomidae e da subordem Percoidei, ordem Perciformes (Figura 1). É única espécie do

gênero e de sua família. Possui distribuição circungalbal nas regiões tropicais e subtropicais em todos os oceanos com exceção do Pacífico Leste (Briggs 1960) (Figura 2).



Figura 1) *Pomatomus saltatrix* (<http://www.dpi.nsw.gov.au>)

Apesar de ser uma espécie cosmopolita, a espécie *Pomatomus saltatrix* é relacionada a regiões costeiras. Podem ser encontradas em quase toda a costa leste da América do Norte, desde o Canadá até o Golfo do México, sendo denominada como *Bluefish*. Ainda no Atlântico Norte, é encontrada na costa sul do continente europeu e em mares adjacentes como Mediterrâneo até o Mar Negro chamado de *Anjora* e *Lufar*. A espécie é encontrada também na costa do Senegal, no continente Africano onde é denominada *Tassergal*. Ainda no continente africano, são encontradas também na porção de Angola até a África do Sul e até a costa leste no Oceano Índico em Madagascar, onde a espécie é chamada de *Elf*. Na Austrália, onde é conhecida como *Tailor*, ocupa tanto a costa leste quanto a oeste, atingindo também a região mais ao sul. Também podem ser encontradas na Malásia. Na América Central, é registrada para o Mar das Antilhas, e na América do Sul é encontrada entre a Venezuela e as Guianas, e entre Brasil e Argentina (LeGall 1934, Briggs 1960, Van der Elst 1976, Champagnat 1983, Valdez e Aguilera 1987, Wilk 1977, Juanes *et al.* 1996), sendo denominadas como Anchova, Enchova ou *Anjova* (Figura 2).

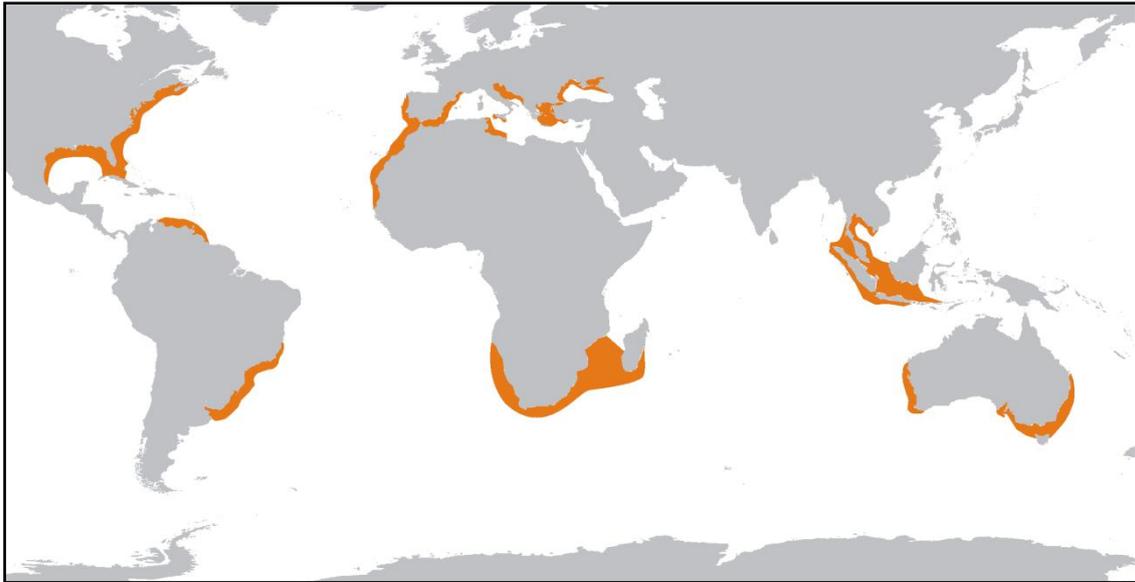


Figura 2) Mapa de distribuição da espécie *Pomatomus saltatrix* derivado de informações da literatura citada e mapa de distribuição de espécie pela FAO (<http://www.fao.org/fishery/species/3102/en>).

As Anchovas possuem hábito pelágico e realizam migrações sazonais bem delimitadas relacionadas à reprodução (Juanes *et al.* 1996). Em algumas regiões, as movimentações, local e época de desova já foram bem documentados (Wilk 1977, Champagnat 1983, Smith *et al.* 1994, Young *et al.* 1999, Ceyhan *et al.* 2007, Silvano e Begossi 2010, Gordina 1996, Juanes *et al.* 1996), mas em outras a informação é incompleta ou inexistente. Como um padrão geral observado, tanto macho como fêmeas da espécie migram em cardumes para latitudes maiores no verão, em regiões de águas mais frias, onde ocorre a fecundação externa a partir da liberação de gametas na coluna d'água (Champagnat 1983). O evento de reprodução pode ocorrer ainda de forma contínua durante alguns meses (Conover *et al.* 2003) ou em mais de um evento (Morley *et al.* 2003, Ditty e Shaw 1995, Ward *et al.* 2003). Com o esfriamento das águas, as anchovas retornam para latitudes menores, em regiões de águas mais quentes, no período de inverno. Devido à diversidade de habitats que elas ocupam, algumas variações desse padrão geral já foram documentadas (Hedger 2010, Sheperd 2006, Ward *et al.* 2003). Onde se tem informações, a distribuição das larvas ocorre em um intervalo de temperatura de 18 a 26°C e salinidade entre 1,7% a 3,8% (Juanes *et al.* 1996).

Alguns autores atribuem os diferentes padrões comportamentais e mais de um evento de desova e recrutamento a uma estratégia de cobertura de risco (*Bet-Hedging*) (Hare e Cowen 1993, Ward *et al.* 2003). É uma estratégia frequentemente observada para peixes que desovam na coluna d'água, proporcionando novos habitats, aumento da

população e potencial adaptativo a condições adversas que possam vir a ocorrer (Lambert e Ware 1984). Já foi suposto que esses diferentes eventos de desova e recrutamento observado para anchovas poderiam gerar uma estruturação populacional ou diferenciação de estoques (Lund e Maltezos 1970). Outro aspecto observado em alguns locais no mundo foram migrações desiguais entre indivíduos adultos e não adultos.

O potencial de dispersão de *Pomatomus saltatrix* pode ser considerado alto devido à sua vasta distribuição. O período pelágico de gametas e larvas na coluna d'água persiste de 66 até 93 dias (Deuel e Clarck 1966, Juanes *et al.* 1996). No entanto, desovas próximas a costa ou fluxo de corrente para o continente (*inshore*) podem levar à entrada em baías e berçários limitando esse potencial. Também já foi documentado que larvas de peixes e de outros grupos podem ser ativas, não sendo influenciadas somente pelo fluxo da corrente a qual estão sujeitas (Cowen e Sponaugle 2009). Foi suposto que os adultos da espécie também poderiam nadar até 2000 km em cerca de um mês (Stehlik 2008). Mas na natureza, apesar da capacidade natatória observada em e, não são observadas migrações tão extensas. Os peixes estão limitados a certa faixa de temperaturas e ao comportamento ecológico para realizar seu ciclo reprodutivo. Os indivíduos que realizam migrações mais extensas são aqueles que possuem maior tamanho e essas são realizadas no período de maior aquecimento das águas e incidências de luminosidade, coincidente com período de verão (Stehlik 2008, Shepherd *et al.* 2006).

Em uma meta-análise sobre taxa de crescimento de anchovas de diversas localidades, é relatada uma distinção entre elas. A taxa de crescimento é um parâmetro importante na delimitação dos estoques pesqueiros tanto da anchova (Austin *et al.* 1999, Turan *et al.* 2006, Dhieb *et al.* 2006) como em outras espécies (Swain e Foote 1999, Cadrin 2000). Nos EUA e Noroeste da África, a taxa de crescimento é a mais alta, com indivíduos tornando-se maduros com 430 a 450 mm, enquanto que no Mar Negro e na América do Sul é considerada moderada (primeiros indivíduos maduros com 340 a 350 mm). As taxas de crescimento mais lentas são atribuídas às regiões da Austrália, Mar Mediterrâneo e Sul da África (250 a 270 mm) (Van der Elst 1976, Champagnat, 1983, Haimovici e Krug 1992).

1.2.2 Aspectos da espécie na costa do Brasil e America do Sul

Na região do Atlântico Sudoeste, as anchovas são mais frequentemente encontradas do Estado do Rio de Janeiro no Brasil até a Bacia do rio da Prata na Argentina

(Haimovici e Krug 1996). No Brasil, poucos são os estudos sobre esta espécie, e os poucos existentes estão concentrados a região mais ao sul de sua distribuição. A dieta das anchovas nessa localidade consiste em sua maioria de peixes pelágicos, sendo em grande proporção a espécie *Engraulis anchoita* (Lucena *et al.* 2000).

Alguns estudos de inferência indireta sugerem padrões de movimentação e época de reprodução na região. No inverno, é reportada uma grande abundância de anchovas no litoral de Santa Catarina. As migrações na Região Sul se iniciam na primavera na direção de maiores latitudes a partir dessa localidade. Atingem o litoral do Estado do Rio Grande do Sul em novembro iniciando as desovas em mar aberto onde ocorrem concentradas. Um desses locais conhecidos de reprodução é o Parcel do Carpinteiro - RS. As anchovas maiores e com acima de aproximadamente dois anos continuam migrando para ao sul quando ultrapassam a costa do Uruguai chegando a Argentina. A desova ocorre de forma continua até o fim do verão por toda a região litorânea dos três países. Os ovos e larvas são carregados pelas correntes na direção sul para a costa, recrutando principalmente na Bacia do Prata (Haimovici e Krug 1992, Haimovici e Krug 1996) mas também na lagoa do Patos - RS (Muelpert e Sinque 1996). Nesse ciclo final da migração e desova, jovens adultos ainda imaturos (<35 cm) não foram reportados. Estes migram mais distantes da região costeira e podem apresentar um padrão de migração um pouco distinto como já reportado na região da América do Norte (Smith *et al.* 1994).

Ainda na Região Sul, Muelpert e Sinque (1996) observaram presença de larvas da espécie desde a latitude 24° S até 35° S (Sul litoral de São Paulo a Bacia do Prata) no decorrer do ano. Do total, cerca de 80% foram coletadas nos meses de Janeiro e Fevereiro entre a latitude 32° S e 34° S (próximo a Lagoa do Patos). Só foram observadas larvas com no máximo cerca de um mês desde a desova, sendo a média de 10 dias, inviabilizando as análises da rotas de dispersão. Esse aspecto sugere um recrutamento a habitats costeiros rapidamente, indicado também pelo aumento do tamanho das larvas em direção a costa. Com o decorrer do ano, quando as anchovas retornam para as menores latitudes, é observada uma proporção de larvas na mesma direção, mas em abundância muito menor.

Na Região Sudeste, do litoral do Espírito Santo até o Sul de São Paulo quase não se tem informação sobre aspectos locais da espécie. Silvano e Begossi (2010), buscando inferir o conhecimento dos pescadores locais sobre esses peixes, estimaram a época de desova com amostras de dois pontos do litoral Sudeste: Rio de Janeiro - RJ e Ubatuba-SP. Baseado no tamanho relativo dos adultos, das gônadas, e índice de IGS observados por estação do ano, esse trabalho sugere que a reprodução se dá nos períodos de verão e

outono ao longo dessas regiões. Estudos sobre migração são inexistentes na costa da região Sudeste, e não possuem dados que suportam que esse grupo faça parte do mesmo estoque da região Sul até Argentina (Haimivici e Krug 1996).

1.2.3 Pesca

A espécie *Pomatomus saltatrix* é um importante recurso pesqueiro. No Brasil e no mundo pode ser observada sua captura de caráter recreativo, comercial (artesanal e industrial) e de subsistência. A pesca esportiva é a principal atividade relacionada às anchovas nas regiões mais desenvolvidas como EUA, Austrália e África do Sul. Nessas localidades a pesca esportiva da espécie corresponde a mais da metade de todos ou outros tipos de captura (Maggs *et al.* 2012, Leigh e O'Neill 2005, Baust *et al.* 2015). Os números de capturas diminuíram consideravelmente em todos esses locais nos últimos 50 anos. A sobre exploração ou risco de sobre-exploração nessas localidades levou a uma forte regulamentação da pesca dessa espécie limitando períodos, tamanhos, e alguns locais de captura além de números máximos de peixes que podem ser carregados por pescadores (Leigh e O'Neill 2005, WRF 2010, Maggs *et al.* 2012, ASMFC 2015).

A pesca comercial da anchova tem maior importância no Brasil e Argentina, no oeste do continente Africano, na costa Atlântica da África do Sul e no Mar Mediterrâneo (Baust *et al.* 2015, Haimovici e Krug 1996, Turan *et al.* 2006, IBAMA/CEPSUL 2009). De 1984 a 2013, a Turquia vem se mostrando como o maior produtor dessa espécie, levando em consideração ainda o seu litoral menor do que outros países produtores. Além da Turquia, o Brasil, Maurítânia, e Estados Unidos, Senegal e Argentina também capturaram números consideráveis ao longo desse período (FAO, Figura 3), comparado as outras áreas onde as anchovas estão distribuídas.

Na Região Sul do Brasil, a anchova é considerada um dos principais recursos pelágicos capturados. As principais formas de pesca são o cerco, o emalhe ou parelhas. Desde 2004, segundo o Ministério do Meio Ambiente (Anexo II da Instrução Normativa MMA nº 05/2004), a espécie é considerada como sobre-explorada, com redução considerável da biomassa abaixo do nível de segurança para a espécie. Os números de capturas chegaram até 27.700 toneladas no ano de 1971, decaindo para cerca de 4.000 toneladas ao ano a partir do ano 2000 (FAO, Figura 4).

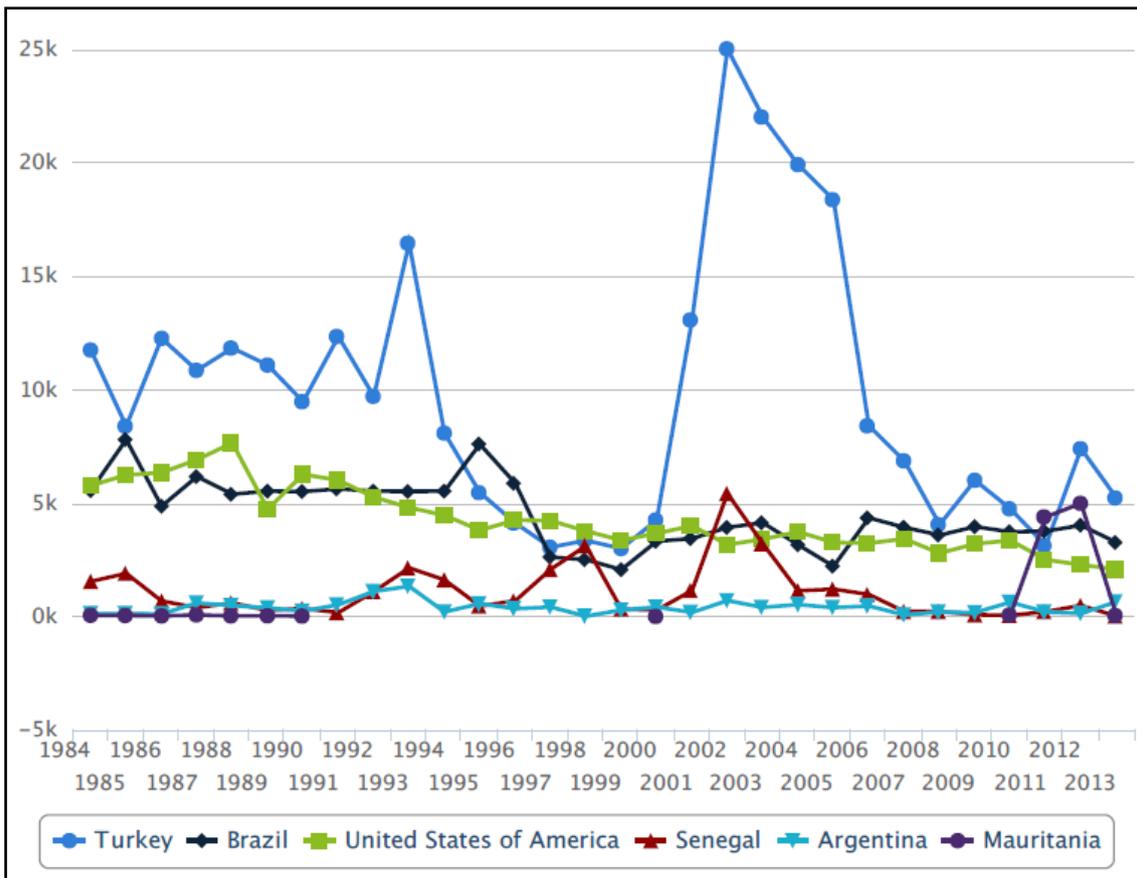


Figura 3) Gráfico produzido no programa online FishStat (data.fao.org) com os principais locais de produção pesqueira da espécie *Pomatomus saltatrix* do ano de 1984 até 2013 em kilo toneladas (t.10³).

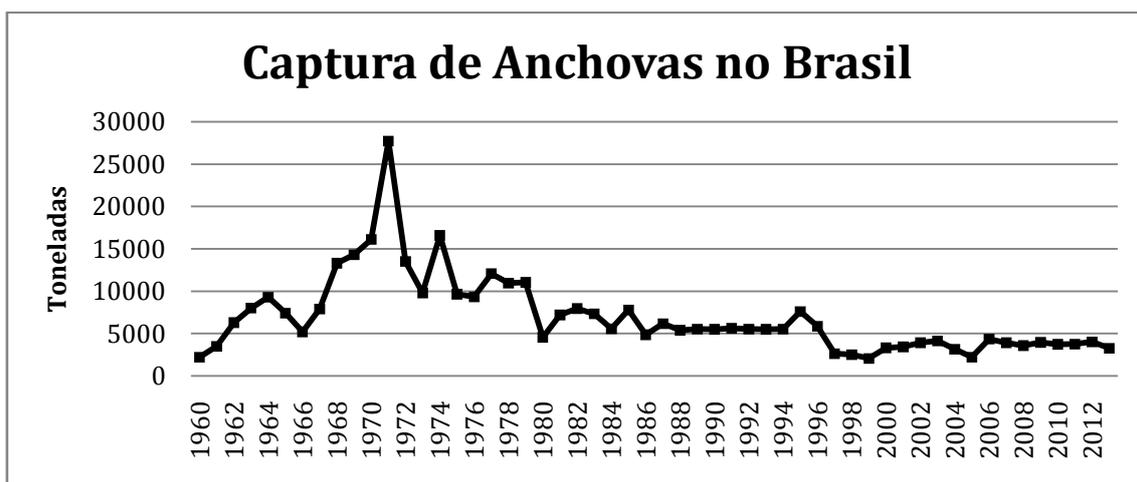


Figura 4) Produção pesqueira da espécie *Pomatomus saltatrix* no Brasil. Dados do período de 1960 a 2013 obtidos pelo programa online FishStat (data.fao.org).

Algumas das medidas de proteção são as proibições da pesca de indivíduos com menos de 35 cm (estabelecida em 2004) nos litorais da Região Sul e Sudeste. Além disso,

foi estabelecido, em 1994, um período de defeso de 4 a 5 meses, dependendo do tamanho e autonomia da embarcação, no litoral da região Sul do Brasil. Apesar das tentativas de monitoramento do recurso, a última reunião técnica para se avaliar e discutir a preservação da espécie pelos órgãos responsáveis foi no ano de 2009 (IBAMA/CEPSUL 2009). Nas últimas décadas, a maioria das anchovas foram capturadas em Santa Catarina e Rio de Janeiro. No Rio Grande do Sul a produção artesanal decaiu de 50% até 1996, a 16% nos últimos anos reportados. Em Santa Catarina, de 88% até a década de 80, se reduziu para 58% a produção de anchovas por comunidades pesqueiras. Os estados de São Paulo e Paraná não apresentam uma captura comercial dessa espécie significativa comparadas aos outros estados. No Rio de Janeiro, no ano de 2007 com o total de 80 toneladas, cerca de 25% foi capturado pela frota artesanal com principalmente rede de emalhe. É o local onde a pesca artesanal ainda é bastante expressiva, mas também apresenta claro declínio de produção (Bender *et al.* 2014). A diminuição da captura desse recurso na Região Sul é atribuída pelos pescadores à concorrência desigual de esforço pesqueiro e do declínio de cardumes de anchovetas e de sardinhas pela pesca, entre outros motivos (IBAMA/CEPSUL 2009). O declínio das capturas de anchova acaba criando consequências sociais a comunidades mais tradicionais.

Além do Brasil, no lado leste da Austrália em comunidades aborígenas (Silvano e Begossi 2005) e no Senegal também existe uma importante captura artesanal (Champagnat 1983) de *Pomatomus saltatrix*, voltada principalmente para a subsistência.

1.2.4 Ecologia Molecular

Apesar da sua vasta distribuição, encontram-se relatos de estruturação populacional das anchovas apenas entre as diferentes regiões continentais (Goodbread e Graves 1996), indicando que o potencial de dispersão é alto, mas não é suficiente no panorama atual para conectar populações entre regiões muito distantes. Essa estruturação continental atual é atribuída a eventos históricos e geológicos de dispersão e vicariância, onde as condições físicas e químicas dos oceanos eram diferentes das atuais em variados momentos (Goodbread e Graves 1996, Pardiñas *et al.* 2010, Miralles *et al.* 2015). A estruturação regional em continentes também é observada em espécies pelágicas com distribuição circumglobal com grande potencial de dispersão como alguns marlins da família Istiophoridae, atuns do gênero *Thunnus*, cavalinhas do gênero *Scomberoo* e dourado *Coryphæna hippurus* (Graves 1998, Díaz-Jaimes *et al.* 2010), mas não foi

observada, até agora, em anchovas. Em um estudo em escala global com enzimas de restrição em DNA mitocondrial, foi observado que a população do Brasil se configura como a mais divergente de todas as outras (Figura 5) e com altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica em relação às demais (Goodbread e Graves 1996). A estimativa de separação desse grupo foi de 1 a 5 milhões de anos, tomando por base taxas evolutivas para essa molécula em grupos de vertebrados.

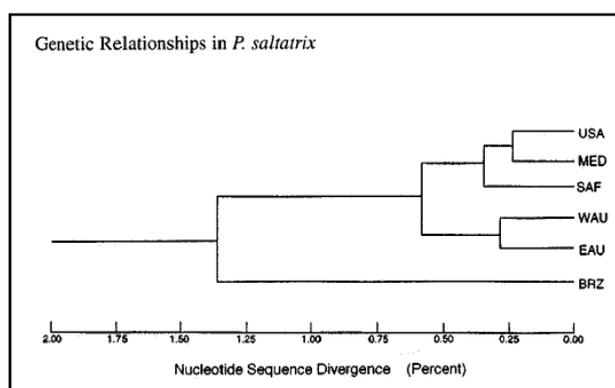


Figura 5) Dendrograma UPGMA de média de divergência nucleotídica de populações de *Pomatomus saltatrix* de diferentes localidades, e as relações filogenéticas entre elas (retirado de Goodbread e Graves 1996).

Alguns trabalhos realizados com isoenzimas localmente na costa dos Estados Unidos e entre localidades da costa leste da Austrália não encontraram estruturação dentro dessas localidades (Graves 1992, Nurthen 1992). No entanto, quando se comparou a costa leste com a oeste, foi observada uma estruturação pela presença de alelos exclusivos em cada lado (Nurthen 1992). Um trabalho mais recente (Miralles *et al.* 2015) inferiu com marcadores mais polimórficos (microssatélites) que a população da costa dos Estados Unidos é panmítica. Nesse mesmo estudo, foi observada uma estruturação pelo marcador mitocondrial *cit b* ($\phi_{ST}=0,75$) entre os lados leste e oeste do Atlântico Norte e uma estruturação em uma escala menor ($\phi_{ST}=0,20$) entre os lados leste e oeste do Mar Mediterrâneo. As mesmas comparações com marcadores de microssatélites chegaram a valores de estruturação de $F_{ST}=0,03$ e $0,06$ respectivamente, sendo o valor de estruturação maior entre os lados do Mediterrâneo do que entre ambos os lados do Atlântico Norte.

Algumas das condições que influenciam a dispersão das populações costeiras na América do Sul podem ser as correntes oceânicas. A Corrente do Brasil é a principal corrente que atua ao longo da distribuição da espécie (Stramma e England 1999) (Figura 2). As anchovas se encontram distribuídas entre duas Ecoregiões definidas por Spawding (2007), que representam áreas geográficas sujeitas a condições físicas e meteorológicas

mais similares entre si, são elas: Ecoregião Tropical do Sudoeste Atlântico, na subdivisão mais inferior (Leste do Brasil-Figura 2-I), e Temperada do Sudoeste Atlântico, em todas suas subdivisões (Figura 2-II).

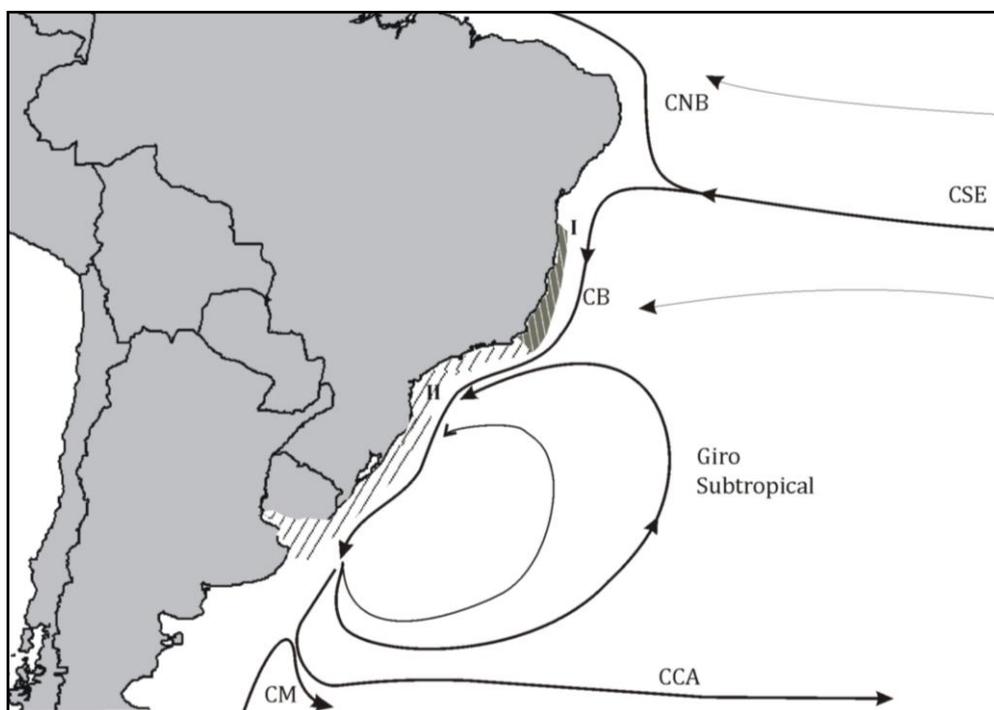


Figura 2) Correntes marinhas que influenciam a região sudeste da América do Sul adaptada de Stramma e England (1999). Corrente Sul Equatorial (CSE); Corrente Norte do Brasil (CNB); Corrente do Brasil (CB); Corrente das Malvinas (CM) e Corrente Sul Americana (CSA). As áreas tracejadas representam a distribuição da espécie *Pomatomus saltatrix*. I) Ecoregião do Sudoeste Atlântico, na subdivisão Leste do Brasil; II) Ecoregião Temperada do Sudoeste Atlântico (Spawding 2007).

Um trabalho preliminar realizado como monografia (Bonetti 2013, não publicado) encontrou uma estruturação populacional baseada em alguns marcadores moleculares, entre as regiões de Rio de Janeiro - RJ e Torres - SC. Os valores de estruturação (ϕ_{ST}) foram altos, de aproximadamente 0,7 para marcadores mitocondriais e nuclear (rodopsina). Outro resultado obtido também foram valores menores, mas significativos, entre esses extremos e a região do Litoral de São Paulo. Haimovici e Krug (1996) sugeriram que o estoque da Região Sudeste seria diferente daquele da Região Sul. A movimentação das populações na região Sudeste é desconhecida, mas a espécie pode ser pescada nessa região durante todo o ano. Foi suposto também que o litoral de São Paulo poderia ser um local de contato entre as populações e que, devido ao hábito migrador da espécie, a composição genética nessa região intermediária poderia variar ao longo do ano.

2 Objetivo

O objetivo geral desta dissertação é analisar a estruturação populacional da espécie *Pomatomus saltatrix* na costa do Atlântico ocidental.

2.1 Objetivos específicos:

- Inferir a estrutura genética populacional de *P. saltatrix* na costa ocidental da América do Sul empregando análises filogeográficas e de genética de populações, a partir de dados de marcadores moleculares mitocondriais (citocromo oxidase I e citocromo b) e nucleares (rodopsina e microssatélites);
- Testar a hipótese da existência de fronteira espacial ou temporal entre as populações sul e sudeste do Brasil na região do litoral de São Paulo;
- Analisar as relações filogeográficas em *P. saltatrix* da América do Sul e do mundo.

3 Material e Métodos

3.1 Delineamento amostral e obtenção de DNA

A anchova é facilmente identificável por ser morfologicamente bastante distinta de todas as outras espécies da pesca, já que é a única espécie do gênero e da família. Foram obtidas 266 amostras de diversas localidades no litoral brasileiro, tentando abranger toda a distribuição da espécie ao longo da costa (Figura 6). Essas amostras foram coletadas em desembarques pesqueiros ou de pequenos comércios locais de peixes entre os anos de 2006 e 2015 (Tabela 1). Além dessas, 30 amostras foram obtidas no litoral de Nova Jersey, Estados Unidos, por colaboradores no período de Agosto de 2012 a Maio de 2013. No litoral norte e sul do Estado de São Paulo, foram feitas coletas específicas, na Primavera de 2013 e no Inverno de 2014, para testar a hipótese de sazonalidade. Outras amostras, coletadas no norte de São Paulo (Ubatuba) no Outono de 2011 também foram incluídas para as comparações sazonais da região. Algumas poucas amostras coletadas nas mesmas localidades, em anos distintos, e que se encaixavam nessas épocas do ano, foram também analisadas juntas a essas. As seguintes siglas apontadas na Tabela 1 foram utilizadas para designar as localidades e épocas de coleta.

Tabela 1) Amostragens realizadas neste trabalho e siglas utilizadas correspondentes.

Coletas	N	Siglas	Data de coleta
Maratáizes e Guarapari – ES	13	ES	10/2006, 09/2013, 10/2013
Macaé e Barra de São João– RJ	22	MAC-RJ	01/2013, 03/2015
Rio de Janeiro - RJ	34	RJA-RJ	10/2007, 04/2012, 6/2013,
Ubatuba – SP Outono	12	SP-N-OTN	04/2011
São Sebastião e Ubatuba – SP Primavera	27	SP-N-PRI	10/2012, 9/2013
Ubatuba – SP Inverno	24	SP-N-INV	6/2011, 6/2014
Cananéia – SP Primavera	40	SP-S-PRI	10/2013
Cananéia – SP Inverno	13	SP-S-INV	7/2014
Florianópolis – SC	13	FLO-SC	5/2013
Cabo de Santa Marta ao Chuí - SC/RS e Torres-RS	40	STA/CHUI	11/2006, 05/2012
Nova Jersey – EUA	30	EUA	08/2012, 05/2013
Total	268		

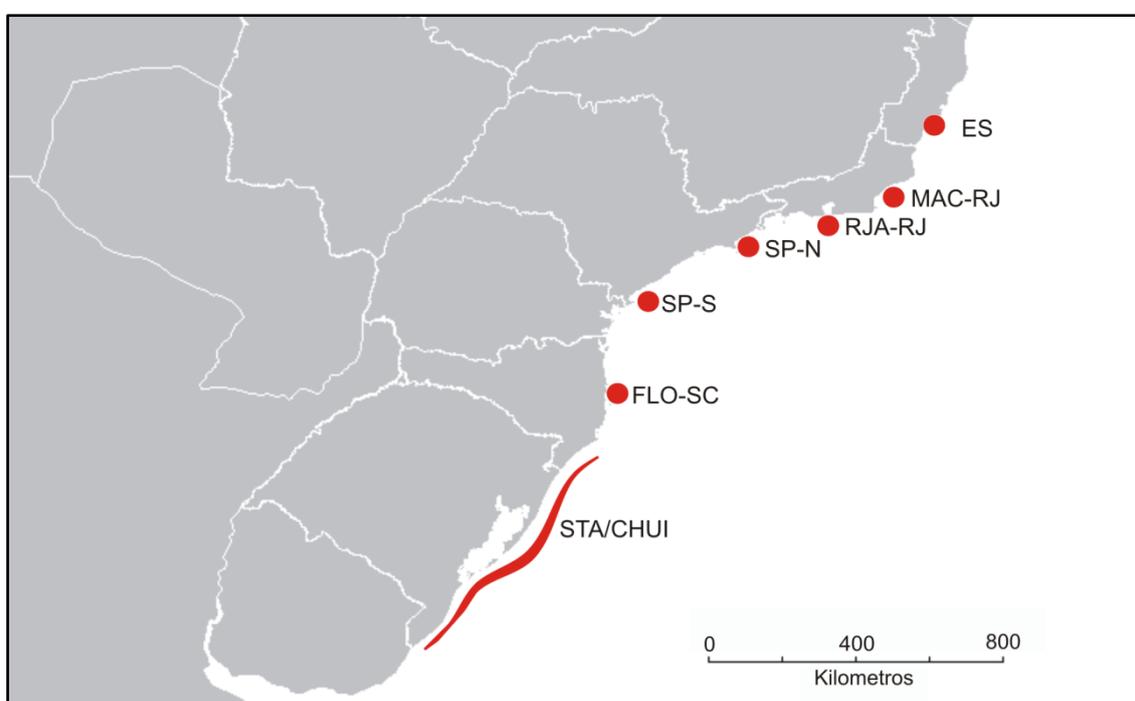


Figura 6) Amostragem realizada de *Pomatomus saltatrix* ao longo de sua área de ocorrência na costa brasileira. Pontos e linhas em vermelho correspondem à Tabela 1.

Com consentimento dos pescadores e comerciantes, foram retirados pequenos pedaços de tecido muscular ou de uma das nadadeiras com auxílio de material de dissecação. As amostras foram colocadas em tubos contendo etanol 98%. Foram armazenadas em freezer (-18 °C) e o material foi adicionado à coleção de tecidos do LBDM, registrada junto ao IBAMA/CGEN como Instituição fiel depositária de Amostras do

Componente do Patrimônio Genético. Essas amostras foram obtidas no âmbito do projeto Rede Nacional de Identificação do Pescado (RENIMP-CNPq-CTA Agro 561749/2010-8).

A aquisição do DNA genômico total foi realizada a partir do protocolo de extração salina de Aljanabi e Martinez (1997), e adaptado em Miller (1988). O fragmento do tecido foi cortado em pequenas partes e colocado em 500µL de tampão de lise (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%, NaCl 50 mM, RNase 1 µg ; pH 8,0). A solução foi mantida durante 15 minutos a 55°C para desestruturação das membranas celulares e degradação o RNA. Após esse período, foi adicionado a cada amostra 6µg de Proteinase K. As amostras voltaram à temperatura de 55°C por duas horas para a digestão das proteínas. Durante esse período, as amostras foram maceradas com um pistilo plástico esterilizado sempre que apresentassem sinais de degradação parcial do tecido, o que muitas vezes ocorre quando utilizamos tecido muscular.

Para a retirada dos restos celulares, utilizamos uma etapa de centrifugação de 15 minutos a 14.000 rpm, transferindo o sobrenadante para outro tubo. Para precipitar as proteínas ainda presentes, adicionamos 300µL de uma solução NaCl 5 M. Essa mistura foi novamente centrifugada por mais 15 minutos também a 14.000 rpm. O sobrenadante foi mais uma vez transferido para um terceiro tubo, onde foi adicionado então 500µL de Isopropanol puro gelado para iniciar o processo de precipitação das moléculas de DNA. Este foi mantido de um dia para o outro a temperatura de -20°C. Após a precipitação do DNA, uma terceira centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm foi realizada. O sobrenadante foi descartado e foi cumprida uma etapa de lavagem do material com etanol 70% para retirar o sal restante. O tubo foi evertido para retirada da maior parte do etanol, e o DNA foi colocado para secar por centrifugação a vácuo no equipamento *Concentrator plus* (Eppendorf) ou deixado a temperatura ambiente para que o etanol evaporasse sozinho. Após essa etapa, o DNA foi solubilizado em 50µL de água ultrapura, e quantificado em um nanofotômetro (*Implen*). Sua concentração foi ajustada para 40ng/µL em placas de 96 poços.

3.2 Análise de sequências de DNA

3.2.1 Amplificação e sequenciamento

Os marcadores sequenciados nessa dissertação foram os genes mitocondriais citocromo oxidase I (COI – região 5) e o citocromo b (cit b - completo) e o gene nuclear da rodopsina. Os genes mitocondriais escolhidos são amplamente utilizados em trabalhos de filogeografia e genética de populações de peixes e de outros grupos taxonômicos (Craig *et al.* 2009). A rodopsina possui uma variabilidade intra-específica menor e é empregada em trabalhos de sistemática filogenética (Von der Heyden *et al.* 2011). Entretanto, se mostrou polimórfica em análises populacionais preliminares de *P. saltatrix* e de outras espécies (Larmuseau *et al.* 2009) complementando as informações de sequências mitocondriais.

Para as reações de amplificação em cadeia dos fragmentos de citocromo b (PCR), foram utilizados iniciadores já descritos na literatura (Sevilla *et al.* 2007). Estes oligonucleotídeos se ligam a regiões codificantes dos tRNAs da Glucosamina e Treonina que são relativamente conservadas e flanqueiam o gene do citocromo b. O gene do citocromo oxidase I foi amplificado por iniciadores descritos primeiramente em Ward *et al.* (2005) e modificados em Rocha *et al.* (2008). Os iniciadores do gene rodopsina também foram descritos em Sevilla *et al.* (2007). Para cada um dos marcadores foram realizadas reações teste para verificar quais as melhores temperaturas e condições de PCR para a espécie. As especificações dos oligonucleotídeos e informações adicionais podem ser consultadas na Tabela 2.

As concentrações de reagentes nas reações foram iguais para os três marcadores. Aproximadamente 40 ng de DNA foram adicionados a uma solução com: 0,25µM de cada iniciador, 0,2mM de cada um dos dNTPs, 1 U de enzima *GoTaq Flexi DNA polimerase* (Promega), 2,5mM de MgCl₂ e 0,25 µg/µL de BSA (albumina de soro bovino), em um volume total por amostra de 15µL de tampão para PCR *Green GoTaq Flexi* (Promega). Para cada conjunto de reações foi incluído um controle negativo (sem DNA) para detectar possíveis contaminações.

O ciclo de temperatura para a multiplicação dos fragmentos depende da temperatura ótima de anelamento dos iniciadores e do tamanho do fragmento alvo. Os ciclos foram: 1 vez a 95°C por 5 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de 35 ciclos que se iniciam pela temperatura de desnaturação a 94°C por 35 segundos, seguido por 20 segundo na temperatura de anelamento dos iniciadores (52°C a 60°C) e de 40 segundos a 1 minuto a 72°C para a extensão das fitas pela enzima Taq polimerase. Finalizando as ciclagens, foi mantida a temperatura de 72°C a 5 minutos de extensão para terminar a polimerização de fitas inacabadas.

Tabela 2) Especificações dos iniciadores utilizados nesse trabalho, e a temperatura de adesão (TA) dos iniciadores mais adequada para a espécie *P. saltatrix*.

Gene	Iniciador	Sequências	pb	%GC	TA (°C)	Referência
cit b	Fish-F	ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC	28	39,3	58	Sevilla <i>et al.</i> 2007
	Truc-R	CCGACTTCCGGATTACAAGACCG	23	56,5		
Rod	F2w	AGCAACTTCCGCTTCGGTGAGAA	23	52,2	60	Sevilla <i>et al.</i> 2007
	R4n	GGAAGTGTTCATGCAGATGTAGAT	28	42,9		
COI	BOL-F1	TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	26	36,5	52	Ward <i>et al.</i> 2005 e Rocha <i>et al.</i> 2008
	BOL-R1	ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA	23	47,8		

Os produtos resultantes da PCR foram visualizados em uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. O gel foi corado anteriormente à corrida com Brometo de Etídeo (10 mg/mL) para a posterior visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta. A quantidade e tamanho dos fragmentos foram estimados com a comparação a escada padrão (*100 pb Plus DNA ladder*) para confirmação da amplificação.

Os produtos de PCR foram purificados através do uso de afinidade pelo revestimento de esferas magnéticas do kit AGENCOURT AMPURE de acordo com as recomendações do fabricante, usando-se programas automáticos na plataforma robótica EPMOTION 5075 (Eppendorf). O purificado foi então submetido a uma reação de terminação de cadeia com dinucleotídeos e dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência (Sanger *et al.* 1977). Foi feita uma reação independente para cada fita da molécula que foram sequenciadas independentemente em equipamento ABI3500, no Laboratório de Biodiversidade Molecular (UFRJ).

3.2.2 Análise dos dados de sequências

Os eletroferogramas de ambas as fitas, de cada amostra, e para cada gene, foram visualizadas e editadas no programa SEQMAN (pacote DNASTAR) gerando sequências consenso. Estas foram alinhadas no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) através do algoritmo de alinhamento CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) com os parâmetros padrão do programa. Foram adicionadas também sequências da espécie estudada de outras

localidades do mundo (Tabela 3) As sequências das extremidades foram cortadas para que todas estivessem no mesmo tamanho.

Os alelos do marcador nuclear rodopsina foram determinados, a partir do padrão de picos duplos de heterozigotos, através do algoritmo *Phase* (Stephens e Donnelly 2003) no programa DNAsp 5 (Librado e Rozas 2009). Os valores da probabilidade da existência de cada alelo hipotético foram verificados e, em casos onde os valores eram menores do que 60%, o indivíduo foi retirado das análises. Esse valor leva a uma eliminação dos alelos raros mas, conservadoramente, evita que permaneçam nas análises alelos que sejam artefatos (Garrick *et al.* 2009).

Tabela 3) Número de sequências de *P. saltatrix* obtidos do *GenBank* (N) por marcador e por localidade, e respectivos códigos utilizados nesse trabalho para designar o conjunto dessas sequências.

Localidades	Marcador/ N/ Código		
	Cit b	COI	rodopsina
Mediterrâneo e Costa Atlântica Europa	6 - MED/NE. ATL	21 - MED	6 - MED/NE. ATL
Austrália	-	5 - AUS	-
Sul da África	-	5 - S. AFR	-
Canadá e Estados Unidos	-	8 - EUA	-
Argentina	-	4 - ARG	-
Brasil- Rio de Janeiro	-	3 - RJA-RJ	-

Após a identificação dos alelos, obtiveram-se dois conjuntos de dados. No primeiro as sequência dos alelos foram consideradas, enquanto que no segundo foi levado em conta suas frequências mendelianas considerando-se o locus como codominante. Cada grupo de dados foi utilizado em diferentes análises dependendo do objetivo. Grupamentos de amostras para todos os genes foram criados no DNASP para teste de hipóteses de estruturação, juntamente com o cálculo de seus índices de diversidade haplotípica e nucleotídica. Os genótipos foram analisados visualmente e foram calculados os índices de heterozigosidade observada e esperada quando em equilíbrio de Hardy-Weinberg, para posterior comparação.

O critério escolhido de agrupamentos foi local de coleta e, no caso das amostras do litoral de São Paulo, também épocas da coleta (Tabela 1). Também no programa DNASP foi realizada a conversão dos alinhamentos para diferentes extensões para dar entrada dos dados em outros programas (ARLEQUIN 3.5 , Excoffier e Lischer 2010 , e NETWORK, Bandelt *et al.* 1999).

3.2.3 Análises filogeográficas

Redes haplotípicas dos marcadores foram construídas e editadas no programa NETWORK 4.6 utilizando o algoritmo *Median-Joining* (Bandelt *et al.* 1999). As figuras que representam a frequência dos haplótipos foram coloridas com o critério de áreas geográficas onde foram coletadas. Essas cores foram padronizadas para as redes dos diferentes marcadores.

Sequências do *GenBank* de espécies de famílias próximas (Miya *et al.* 2013) foram adicionadas aos alinhamentos para enraizar as árvores como Grupo Externo (Anexo I). Inicialmente foram inferidos os modelos evolutivos que melhor se adequaram aos dados baseados no critério Bayesiano de inferência (BIC), pelo método MODEL TEST implementado no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011), sendo feitas separadamente para cada marcador.

As inferências filogenéticas foram realizadas pelo método Bayesiano no programa MRBAYES 3.2.3 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Esse tipo de análise requer um alto custo computacional, portanto foram corridas em uma plataforma online (CIPRES, Miller *et al.* 2010). O método Bayesiano utiliza diferentes cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC) para buscar os agrupamentos filogenéticos com maior probabilidade posterior dentro de inúmeras possibilidades. As cadeias iniciais geralmente variam muito até encontrar um conjunto de soluções com aumento significativo desses valores. Árvores inicialmente geradas ainda se encontram nessa fase de alta variação, então 25% do início da corrida (*burn-in*) foi excluído. As árvores posteriores foram amostradas a cada 1000 cadeias. As repetições dos agrupamentos mais frequentes formaram a probabilidade posterior do suporte dos resultados.

As inferências geradas foram visualizadas e editadas com auxílio do programa FIGTREE (Rambaut 2009). Dois tipos de análises de delimitação de espécies foram feitas para verificar se linhagens da inferência filogenética poderiam ser tratadas como espécies diferentes. A primeira foi o método de descoberta automática de intervalos de *Barcode* (ABGD, *Automatic Barcode Gap Discovery*) (Puillande *et al.* 2011), que infere, através das distâncias gênicas entre os táxons terminais, se existe uma descontinuidade de distribuição das distâncias entre eles. Esse teste foi realizado online no site <abgdweb.html>. Inicialmente é necessário definir a taxa que caracteriza mudança de distância intraespecífica para interespecífica, e depende do grupo a ser analisado. É recomendável, pela descrição da análise, utilizar entre 1 a 3 % dessa taxa (P). A análise foi feita com taxas P de 1,5%, 2%, 2,5% e 3% para cada marcador. A outra análise aplicada foi

a Bayesiana de Poisson (*Bayesian Poisson Tree Processes*, bPTP), na qual, o número de substituições entre ramos é quantificado e ponderado em relação ao grupo externo (Zhang *et al.* 2013). Essa análise foi executada também online no site <species.h-its.org/ptp>. O resultado é refletido no número de suporte dos ramos.

3.2.4 Análises de Estruturação populacional

Um cálculo de diferenciação modificado a partir do índice de endocruzamento F_{ST} (Wright 1949) que leva em conta, além da frequência dos haplótipos, também a distância p como vetores de variação foi empregado. Essa metodologia (ϕ_{ST}) adiciona mais informação às análises populacionais do que somente a informação de frequências haplotípicas (Hudson's *et al.* 1992). O índice ϕ_{ST} foi calculado no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer 2010) para os três marcadores par a par entre as regiões de coleta e, separando as coletas de diferentes sazonalidades do litoral de São Paulo. Baseado nos resultados obtidos nessa análise foi optado por tratar as amostragens locais e temporais do litoral paulista separadamente. A significância desses resultados se deu por 10.000 permutações aleatórias. O valor estatístico de p obtido para cada comparação reflete a frequência de permutações aleatórias que levam aos mesmos resultados observados. Geralmente são considerados significativos aqueles que demonstram menos de 5% de concordância, ou seja, a chance do resultado obtido ser ao acaso precisa ser menor do que 5%. Múltiplas comparações também aumentam a chance de resultados significativos ao acaso. Um método bastante utilizado para controlar erros do tipo I (rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira) é a correção de Bonferroni (Rice 1989) onde o valor de p (0,05) para rejeitar a hipótese nula é dividido pelo número de comparações realizadas. No entanto, este método é conservador demais, subestimando os resultados quando as comparações são muitas, levando a erros do tipo II (não rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa). Para isso, um teste menos conservador é o de *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini e Hochberg 1995) que vem sendo mais utilizado trabalhos de genética da conservação (Narum 2006). No presente estudo, foi utilizada essa correção nas análises com comparações múltiplas.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) particiona a variação de frequências e de distância genética entre haplótipos observados total em três componentes. A partição é feita de forma hierárquica: variação total entre os grupos previamente estabelecidos (ϕ_{CT}), entre as localidades dentro desses grupos (ϕ_{SC}) e a estruturação total da população (ϕ_{ST}). A melhor hipótese de estruturação é aquela que apresenta a maior variância entre os

grupos em relação à variância dentro dos grupos. Essa análise foi realizada no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). Devido às hipóteses possíveis serem muitas considerado o número de localidades, foram utilizados como critérios para os agrupamentos a proximidade geográfica, a época de coleta e os valores de endocruzamento já obtidos de ϕ_{ST} par a par. Essa análise foi realizada para todos os genes, com 1000 permutações para testar a significância dos resultados.

3.3 Microssatélites

3.3.1 Amplificação e sequenciamento

Os microssatélites são sequências de DNA de pequeno tamanho constituídos de repetições simultâneas de um conjunto pequeno de bases, o chamado motivo dos microssatélites. São altamente polimórficos e por isso possuem variabilidade mesmo entre indivíduos, sendo importantes para análises de estruturação populacional a um nível mais apurado (Kashi *et al.* 1997). Para complementar o estudo das populações de anchova foram utilizados oito pares de oligonucleotídeos iniciadores homólogos para microssatélites de motivos de quatro bases (TATC) descritos em Dos Santos *et al.* (2008). Esses já foram utilizados para elucidar a estruturação populacional da espécie entre Atlântico Norte e mar Mediterrâneo (Miralles *et al.* 2014a 2014b).

Para a amplificação e genotipagem desses fragmentos, foi utilizada a técnica de iniciador com cauda, descrita em Schuelke (2000) exemplificada na Figura 7. Os iniciadores de direção *Forward* de todos *loci* foram sintetizados com uma cauda M-13 na extremidade 5' (5' TGTAACGACGGCCAGT 3'). Nas reações de PCR, o complementar do fragmento M-13 é amplificado junto ao fragmento alvo. Em uma ciclagem posterior, a cauda M-13 é anelada a uma sequência complementar marcada com um fluoróforo (VIC, NED, PET ou 6-FAM. Essa construção final então possui: a fluorescência escolhida, a sequência M-13, o fragmento alvo e a sequência do iniciador *Reverse*.

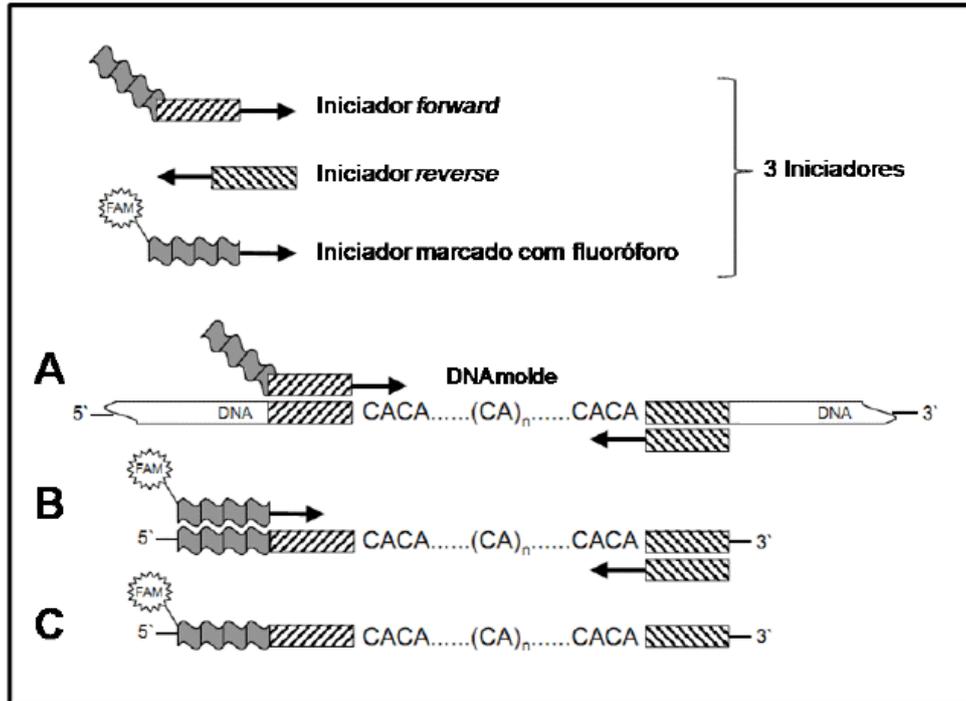


Figura 7) Figura modificada de Schuelke (2000) onde o método iniciador com cauda é descrito. A) Amplificação do fragmento alvo pela ligação iniciador *Foward* com cauda M-13 na fita simples e iniciador *Reverse*. B) Produto resultante da primeira ciclagem sendo amplificado novamente a partir de iniciador Reverso e cauda M-13 com fluoróforo. C) Construção final produto das análises.

As temperaturas de adesão (TA) dos iniciadores descritos para a espécie e as concentrações de $MgCl_2$ foram testadas e otimizadas para os exemplares deste trabalho. As especificações dos iniciadores e condições utilizadas podem ser consultadas na Tabela 4. As concentrações utilizadas dos reagentes para amplificar e criar essa construção descrita foram aproximadamente 40 ng de DNA, 0,2 μM do iniciador *Foward*, 0,8 μM do iniciador sentido *Reverse*, 0,4 μM da cauda marcada com fluoróforo, 0,2 mM de cada um dos dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$, 1 U de enzima *GoTaq Flexi DNA polimerase* (Promega), 1x Tampão para PCR *Green GoTaq Flexi* (Promega) e 0,25 mM de BSA (albumina de soro bovino) em um volume total por amostra de 10 μL . Todos os conjuntos de reações levaram um controle negativo para que possíveis contaminações fossem detectadas.

O ciclo de temperatura utilizado foi: uma vez a 95°C por cinco minutos para desnaturação da dupla fita de DNA; 30 vezes a 95°C por 50 segundos seguido pela temperatura de adesão dos iniciadores (56°C a 64°C) durante 20 segundos e de 30 segundos a 72°C para a extensão das fitas pela Taq Polimerase, e uma vez a 72°C por 30 minutos de extensão final para terminar a polimerização de fitas inacabadas. Os produtos

resultantes da PCR foram visualizados em uma corrida de eletroforese em gel de Agarose 2,5%, com tampão TBE 0,5x. O gel foi corado anteriormente à corrida com Brometo de Etídeo na concentração final de 10 mg/mL para a posterior visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta. A quantidade e tamanho dos fragmentos foram estimados com a comparação a escada padrão *100 pb Plus DNA ladder*.

Tabela 4) Especificações dos Iniciadores de microssatélites utilizados nesse trabalho. F=Foward, R=Reverse.

<i>Locus</i>	Motivo	Iniciador	Sequência	TA (°C)
Elf17	(TATC)	F	TTCCACTTCCTCCTACTTTC	60
		R	GCAGGCTAATAATCGTTGAC	
Elf19	(TATC)	F	GCGACGGCTCTGTCTATGTG	62
		R	GAGGCTGAGACGGGTTCTTG	
Elf37	(TATC)	F	TGCTCGGCTACAATAACG	60
		R	GACCTGTCAGTGGAGATTC	
Elf39	(TATC)	F	TAGTGGTTCTGGGCAACAGG	64
		R	TATCCGGGCTGTACTGTTGG	
Elf44	(TATC)	F	ACTTGGGGTTGGGCAATATG	48
		R	ATTTACAGCACAGGAAGAC	
Elf46	(TATC)	F	TCAGATTACCCTCCCTGTTC	64
		R	TGTAGATGTGCTGGTGATCC	
Elf49	(TATC)	F	TACACCATGAGTGAACAAAG	56
		R	ATGAGAAGAAGGAAGCTAAG	
Elf50	(TATC)	F	AAGCACATACCTGACATATC	56
		R	CAAACCTGGAGTCACTTTTC	

Foram montados dois painéis dos marcadores para serem genotipados. Cada painel continha quatro *loci* que foram escolhidos pelo intervalo de tamanho dos fragmentos e de caudas marcadas para que pudessem ser identificados posteriormente. Os produtos amplificados dos 4 *loci*, por amostra, eram então agrupados em uma única placa. As fitas foram diluídas em formamida para romper o emparelhamento de bases, e adicionada uma escada padrão *Lis 600*. Foram desnaturadas a 95°C e imediatamente colocadas no gelo. Os fragmentos foram detectados por eletroforese em capilares no sequenciador ABI3500.

3.3.2 Processamento dos dados e polimorfismo dos marcadores

Os eletroferogramas resultantes das genotipagens foram visualizados no programa GENEMARKER 6.4 (SoftGenetics LLC) onde os genótipos foram atribuídos e editados individualmente. Devido a pequenas variações nas corridas, diferenças podem ocorrer no tamanho detectado pela escada padrão. Esses valores foram corrigidos utilizando a ferramenta AUTOBIN (CGFB). Diferenças também podem ocorrer entre as genotipagens de um mesmo marcador entre corridas. Para evitar esse problema, foi utilizada a repetição de pelo menos três indivíduos amplificados na reação anterior como controles entre genotipagens. Indivíduos que apresentaram uma porcentagem de amplificação de todos *loci* menor do que 30% foram retirados das análises a fim de diminuir a falta de dados (*Missing data*). Os dados dos genótipos foram então compilados em uma tabela e transformados para os arquivos de entradas de todas as análises no programa CONVERT 1.3.1 (Glaubitz 2004).

Os dados foram agrupados de três formas: reunindo todos os espécimes; separando Brasil e Estados Unidos; e separando as amostragens do Brasil (Tabela 2). No programa GENEPOP 4.2 (Raymond e Rousset 1995) foram calculados os números e frequência dos alelos, as heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) baseados no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Desvios desse equilíbrio foram testados, assim como se existiam indícios de ligação entre *loci*. As significâncias das diferenças foram corrigidas por FDR.

A presença e a porcentagem de alelos nulos foram estimadas no programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) pelo algoritmo *Brookfield*. Alelos nulos são alelos não amplificados, em geral causados por polimorfismos nas áreas flangeadoras onde os iniciadores se ligam e que inviabilizam a sua amplificação ou diminuem sua eficiência. Outros erros podem ocorrer como a amplificação preferencial de alelos de menor tamanho ("*large allele dropout*"). Baixas quantidades de DNA podem levar também a amplificação preferencial de somente um alelo (Guichoux *et al.* 2011). O programa MICROCHECKER também detecta algumas dessas falhas. Alelos nulos resultam na presença de falsos homozigotos, que podem levar a resultados não reais de déficit de heterozigotos, levando a um falso positivo principalmente nos valores de fixação de F_{IS} .

3.3.3 Análises de Estruturação populacional

O índice de endocruzamento F_{IS} (Wright 1949), que depende de dados genotípicos, foi calculado. Esse índice demonstra se existe um desvio, dentro de um grupo determinado *a priori*, entre homozigotos observados e aqueles esperados para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Geralmente se apresentam altos quando esta ocorrendo na população um alto índice de endocruzamento, levando a um aumento da homozigosidade. No entanto, seu valor pode se apresentar alto também quando se mostra sob efeito *Wahlund*, ou seja, um déficit de heterozigoto artificialmente gerado quando duas populações naturais são erroneamente interpretadas como uma única população. O índice foi calculado para o conjunto de amostras dos EUA e do Brasil, e para as localidades dentro do Brasil no programa FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). A significância do F_{IS} ($H_0: F_{IS}=0$), foi verificada através de permutações, e ajustada através de FDR. Os mesmos índices foram calculados retirando os *loci* com mais de 15% de alelos nulos para comparação com os resultados obtidos anteriormente. Os *loci* com presença de alelos nulos não foram retirados imediatamente das análises para que pudesse ser testado o efeito *Wahlund* a partir de análises diferenciadas das amostras (veja a seguir).

O índice de estruturação populacional F_{ST} foi calculado para os microssatélites entre as amostragens realizadas. O índice mede o grau de estruturação baseando-se nas variâncias dentro das populações e entre as populações nas frequências genotípicas. As significâncias dos F_{ST} ($H_0: F_{ST}=0$) foram estimadas através de permutações (1000) dos dados. A mesma análise foi realizada retirando os *loci* que se apresentaram com maiores porcentagens (0,15) de alelos nulos e aqueles que se apresentaram em desequilíbrio de ligação para comparação com os resultados obtidos anteriormente. Nesse caso não foram retirados imediatamente pelo mesmo motivo citado na análise anterior. Assim como para os marcadores gênicos, também foi realizada a análise molecular de variância para os Microssatélites (método já introduzido no item 3.2.4). No entanto para esses marcadores a análise foi feita com base nas frequências de múltiplos *loci* concomitantemente (*multilocus*), e não separadamente. Esses índices foram obtidos também no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). Permutações (1000) inferiram a significância dos resultados.

Uma análise Bayesiana de atribuição foi realizada para estimar qual seria o número de populações que mais bem explicaria a variação total dos indivíduos. Uma vez estimado esse número, a análise também permitiu estimar quais indivíduos pertenciam a quais populações sem um agrupamento *a priori*. Essa análise foi realizada utilizando os

mesmos preceitos descritos no tópico 3.2.3, no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2010). Um milhão de cadeias de MCMC foram utilizadas para buscar os melhores agrupamentos. Na primeira análise, as hipóteses testadas foram de 1 a 10 populações (K) com 10 réplicas para cada hipótese. As 100.000 primeiras cadeias foram descartadas para retirar a variação inicial. A probabilidade posterior foi calculada ao final de todas as corridas. O valor médio e variância entre eles foram obtidos no programa online STRUCTURE HARVASTER (Earl 2012). Esses valores de probabilidade posterior de saída do STRUCTURE puderam ser visualizados em forma de gráfico. Segundo (Rosenberg *et al.* 2001) os valores de K reais são aqueles de um grande aumento com relação ao valor anterior, e seguidos por um platô de valores maiores mas de subida não abrupta. Outro método utilizado para comparação e escolha do melhor K é baseado no maior valor de ΔK (Evanno *et al.* 2005). É um cálculo de segunda ordem, baseado na variação das probabilidades entre os diferentes K.

A análise Bayesiana de atribuição foi realizada primeiramente com todas as amostras e posteriormente somente com as amostras do Brasil, utilizando menos hipóteses de K dentro do esperado para diminuir o custo computacional, mas ainda assim com 10 corridas para cada uma. Todas as corridas utilizaram o modelo *Admixture*, que permite que o indivíduo amostrado possa ter seu genótipo dividido entre os grupos formados. A representação gráfica do resultado final da análise é um gráfico de barras com a probabilidade para cada indivíduo (Q) de pertencimento a cada grupo. Foram realizadas corridas com frequências correlacionadas e não correlacionadas, e também sem e com a adição de um pré-agrupamento (*prior*) para verificar se separação se resolveria melhor utilizando as localidades geográficas como informação. Para as corridas com *prior* foram calculadas as médias do índice r, que infere o quanto a informação de pré-agrupamento utilizada foi informativa para a análise. Valores de r menores ou igual a um são referentes à *priors* informativos, enquanto que valores médios maiores do que um refletem incongruência de *prior* e estruturação dos dados (Hubisz *et al.* 2009). As corridas para os valores de K considerados relevantes foram compiladas pelo programa CLUMPP 1.1 (Jakobsson e Rosenberg, 2007) utilizando o algoritmo *Greedy*. Os gráficos gerados foram editados pelo programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

3.4 Comparações entre marcadores

A utilização de diferentes marcadores moleculares é a forma mais completa de inferir padrões evolutivos históricos das populações e o cenário de estruturação recente. Isso porque cada marcador possui uma natureza evolutiva, diferentes taxas de mutação e formas distintas de herdabilidade (Sunnucks 2000). A comparação entre eles pode evidenciar aspectos ecológicos e históricos importantes (Sala-Bozano *et al.* 2009, Avise 1987).

Para verificação de se os padrões entre os marcadores são coincidentes, foram montadas tabelas de contingência. Para essa comparação foi utilizada a informação de linhagens formadas nas redes haplotípicas. Para as comparações entre genes e microssatélites, foram feitas novas corridas no STRUCTURE utilizando a informação de linhagens obtida para os genes como agrupamentos *a priori*. Esses agrupamentos não interferem na formação dos clusters finais, mas permitem uma identificação mais fácil dos indivíduos que pertencem a agrupamentos diferentes dos iniciais. Como o modelo mistura a ancestralidade entre populações de cada parte do genótipo do indivíduo, foi utilizado o valor de pertencer a cada grupo (Q) acima de 50% para considerar como de um grupo ou de outro. Na comparação com o marcador da rodopsina, os indivíduos com valor Q de 40 a 60% no gráfico de barras, foram classificados com heterozigotos, e acima de 60% considerados como de um grupo ou de outro. O índice de significância foi obtido pelo cálculo de Quiquadrado. As comparações realizadas foram: cit b versus COI, mtDNA versus rodopsina, mtDNA versus Microssatélites e rodopsina versus Microssatélites.

4 Resultados

Essa sessão foi dividida conforme descrito em Material e Métodos. Foram produzidas para esta dissertação 740 sequências de DNA (cada uma sequenciada nos dois sentidos, ou seja, 1.480 sequenciamentos), e 2.096 genotipagens de microssatélites. A primeira parte desta sessão descreve os resultados obtidos nas análises de sequências, a segunda parte para os microssatélites e a terceira as comparações entre todos os marcadores.

4.1 Genes

4.1.1 Diversidade

Foram obtidas 250 sequências (das quais 6 do *GenBank*) de citocromo b, com tamanho final do alinhamento de 688 pares de bases. Foram observados 97 sítios polimórficos, sendo 61 informativos e 31 mutações únicas, em 84 haplótipos. A diversidade haplotípica (h) do conjunto total de dados foi de 0,96, e a diversidade nucleotídica (π) foi 0,013. As amostragens do Brasil obtiveram índices de $h = 0,94$, e $\pi = 0,010$, maiores do que observado em ambos os lados do Atlântico Norte (EUA e ATL. NE/MED). A diversidade haplotípica (h) nas subdivisões locais variou de 0,60 a 0,98 e diversidade nucleotídica (π) variou de 0,001 a 0,011, sendo os valores mais altos de ambos os índices para as amostragens do litoral norte de São Paulo (SP-N-PRI e SP-N-INV). Esses resultados e outros podem ser consultados na Tabela 5.

Para o gene citocromo oxidase I, foram alinhadas 215 sequências somadas a 46 retiradas do *GenBank*. O tamanho total obtido foi de 481 pares de bases, sendo reconhecidos 52 sítios polimórficos dos quais 33 informativos e 19 mutações únicas, em 54 haplótipos. A diversidade haplotípica total foi de 0,88 e a diversidade nucleotídica foi de 0,016. Nas subdivisões menores no Brasil, os índices de diversidade haplotípica variaram de 0,016 (em RJA-RJ) a 0,89 (SP-N-INV), enquanto que a diversidade nucleotídica variou de 0,0001 (em RJA-RJ) a 0,012 (FLO-SC). Os resultados podem ser consultados também na Tabela 5.

Foram sequenciados 223 fragmentos do gene nuclear rodopsina com 294 pb, somados a seis sequências retiradas do *GenBank*. O algoritmo Phase reconstruiu quatro haplótipos com base em três sítios polimórficos, considerando a probabilidade de existência desses nas populações de acima de 60% (Anexo II). A diversidade haplotípica (h) total foi de 0,63 e diversidade nucleotídica (π) de 0,005. Os índices variaram entre 0 e 0,52 (h) e de 0 a 0,005 (π) e podem ser conferidos na Tabela 6. Na análise dos alelos, 12 heterozigotos puderam ser identificados na amostragem do Brasil ($H_o = 0,07$; $H_e = 0,51$) (Anexo II). Nas amostragens do Brasil, o índice de Heterozigosidade observada difere do esperado sob equilíbrio de HW. Os dados podem ser consultados no Anexo II e Tabela 7.

Tabela 5) Variabilidade genética de *P. saltatrix* para os marcadores mitocondriais (cit b e COI). Número de sequências (N), número de haplótipos observados (Nh), Diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π). As siglas de localidades correspondem às descritas na Tabela 1 e Tabela 3.

Gene	cit b				COI			
Localidade	N	Nh	h	π	N	Nh	h	π
ES	11	6	0,72	0,003	11	3	0,34	0,001
MAC-RJ	9	7	0,94	0,007	9	4	0,58	0,010
RJA-RJ	34	12	0,88	0,003	37	4	0,16	0,0001
SP-N-OTN	11	7	0,87	0,004	5	2	0,46	0,007
SP-N-PRI	29	22	0,98	0,011	29	11	0,89	0,009
SP-N-INV	21	16	0,97	0,011	16	10	0,93	0,010
SP-S-PRI	36	22	0,95	0,011	17	7	0,77	0,010
SP-S-INV	10	7	0,86	0,006	12	8	0,89	0,006
FLO-SC	13	10	0,92	0,010	13	7	0,87	0,012
STA-CHUÍ	39	21	0,91	0,006	40	12	0,86	0,008
Brasil	214	68	0,94	0,010	189	31	0,79	0,010
ARGENTINA	-	-	-	-	4	3	0,83	0,002
AM. SUL	-	-	-	-	193	31	0,79	0,010
EUA	30	12	0,81	0,003	37	12	0,78	0,003
ATL. NE/ MED	6	3	0,60	0,001	21	5	0,71	0,003
S.AFR	-	-	-	-	5	3	0,70	0,003
AUS	-	-	-	-	5	2	0,40	0,001
TOTAL	250	84	0,95	0,013	261	54	0,88	0,016

Tabela 6) Variabilidade genética de *P. saltatrix* para o marcador nuclear rodopsina. Número de sequências (N), número de haplótipos observados (Nh), Diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π). As siglas de localidades correspondem às descritas na Tabela 1 e Tabela 3.

rodopsina				
Localidade	N	Nh	h	π
ES	11	1	0	0
MAC-RJ	6	2	0,41	0,004
RJA-RJ	34	3	0,14	0,001
SP-N-OTN	7	2	0,26	0,002
SP-N-PRI	32	2	0,43	0,004
SP-N-INV	15	2	0,41	0,004
SP-S-PRI	34	3	0,52	0,005
SP-S-INV	3	1	0	0
FLO-SC	12	2	0,51	0,005
STA-CHUÍ	39	2	0,21	0,002
BRASIL	193	3	0,51	0,005
EUA	30	1	0	0,000
ATLNE/MED	6	1	0	0
TOTAL	229	4	0,63	0,005

Tabela 7) Frequência de alelos encontrados por localidade no marcador nuclear rodopsina. Heterozigosidade observada (Ho) e esperada em populações em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (He-EHW).

Localidade	f (A)	f (B)	f (C)	f (D)	Ho	He -EHW
ES	0	1	0	0	0	0
MAC-RJ	0,25	0,75	0	0	0,17	0,38
RJA-RJ	0,04	0,93	0	0,03	0,03	0,16
SP-N-OTN	0,14	0,86	0	0	0	0,24
SP-N-PRI	0,74	0,26	0	0	0,06	0,38
SP-N-INV	0,73	0,27	0	0	0,13	0,39
SP-S-PRI	0,52	0,47	0	0,01	0,15	0,51
SP-S-INV	1	0	0	0	0	0
FLO-SC	0,54	0,46	0	0	0,08	0,50
STA-CHUÍ	0,88	0,12	0	0	0,03	0,49
BRASIL	0,51	0,48	0	0,01	0,07	0,51
EUA	0	0	0,98	0,02	0,03	0,04
ATLNE/MED	0	0	1	0	0	0

O marcador cit b se mostrou com grau maior polimorfismo do que os outros marcadores, em quanto o marcador nuclear foi o que apresentou os menores índices de diversidade. Em geral o Brasil apresentou diversidades mais altas do que as outras localidades amostradas. Sendo na maioria dos casos, as taxas mais elevadas, entre o litoral Norte de São Paulo e Florianópolis-SC, e as menores taxas em Espírito Santo e Rio de Janeiro (RJ).

4.1.2 Análises Filogeográficas

Redes haplotípicas

A rede do marcador citocromo b reconstruiu quatro grupos de haplótipos distintos relativamente bem separados (Figura 8). A composição geográfica entre eles se mostrou bem evidente e os grupos dos EUA e NE. ATL/MED foram compostos por somente haplótipos exclusivos. Os outros dois grupos, apontados na rede como A e B, são formados pelas sequências do Brasil. Esses haplogrupos não foram exclusivos por localidade, mas se mostram com uma composição geográfica distinta. ES e RJA-RJ obtiveram haplótipos somente de um dos grupos (B). A região mais ao sul do Brasil (STA/CHUI) apresentou a maioria de seu haplótipos no grupo A e as sequências de FLO-SC, SP-N e SP-S se distribuíram de forma mais balanceada entre os dois grupos. Os dois agrupamentos do Brasil se separam por seis mutações (distância $p=0,9\%$), similar ao entre o grupo A e o grupo de EUA, mas menor do que entre EUA e NE. ATL/MED que apresentaram oito mutações entre si (distância $p=1,2\%$).

A rede do marcador citocromo oxidase I formou seis grupamentos distintos de haplótipos (Figura 9). Não houve compartilhamento de haplótipos entre diferentes continentes. Apesar de não compartilharem haplótipos as sequências NE.ATL/MED e S.ÁFR se apresentaram muito próximas, com somente uma mutação de diferença (distância $p=0,2\%$). As amostras do Brasil e da Argentina formaram dois grupos separados por cinco passos mutacionais (distância $p=1\%$). A composição desses grupos foi igual a composição de A e B da rede cit b, considerando cada amostra individualmente amplificada em ambos marcadores. Portanto os mesmos padrões de proporção de localidades por grupos de haplótipos descritos para o cit b se repetiram no gene COI.

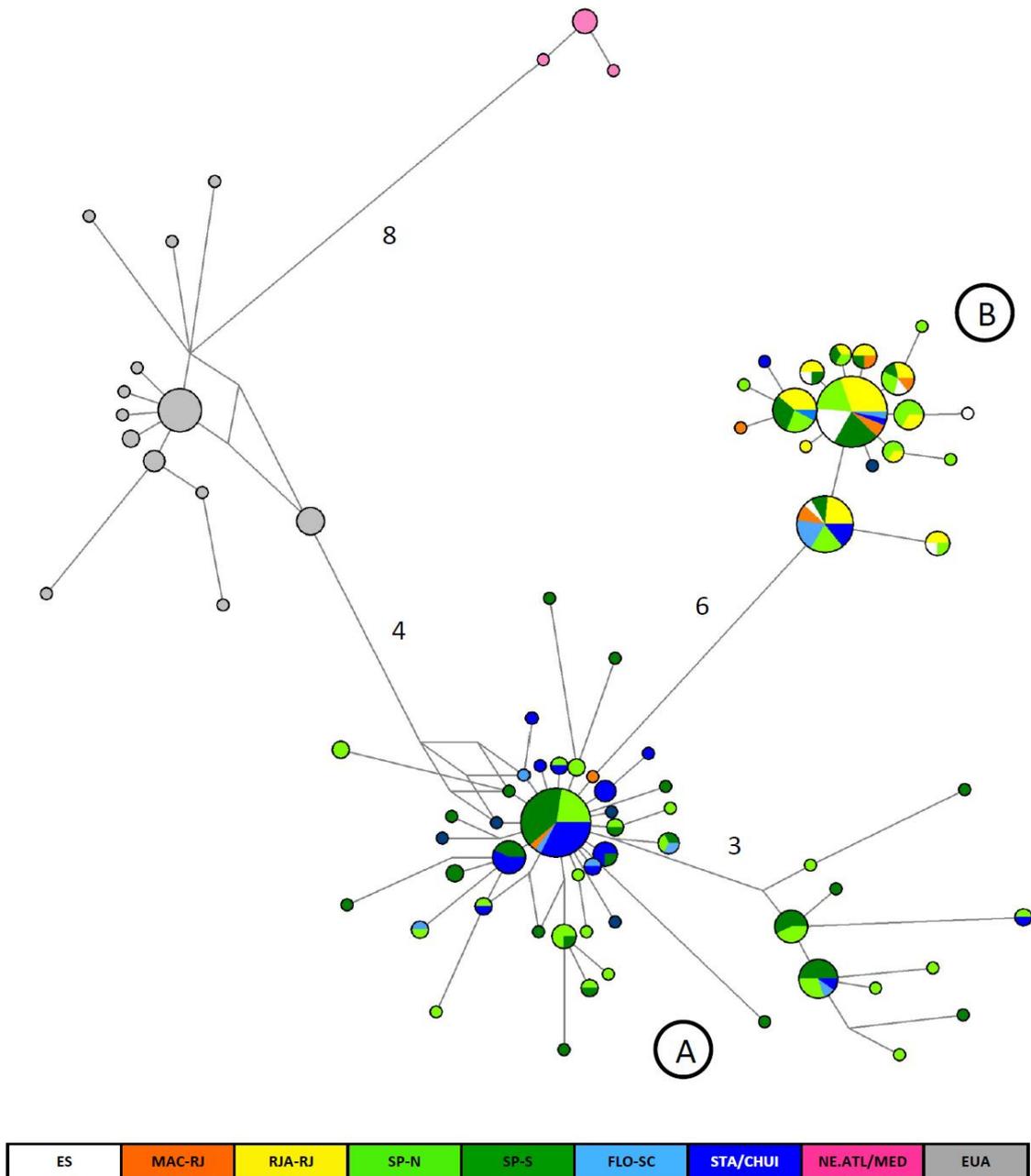


Figura 8) Rede haplotípica do marcador citocromo b. Cada círculo representa um haplótipo, com o tamanho proporcional a frequência apresentada. As cores indicam a localidade de procedência conforme a legenda. A e B indicam os grupos de alelos distintos observados para as amostras de Brasil. As siglas estão de acordo com a Tabela 1 e Tabela 3.

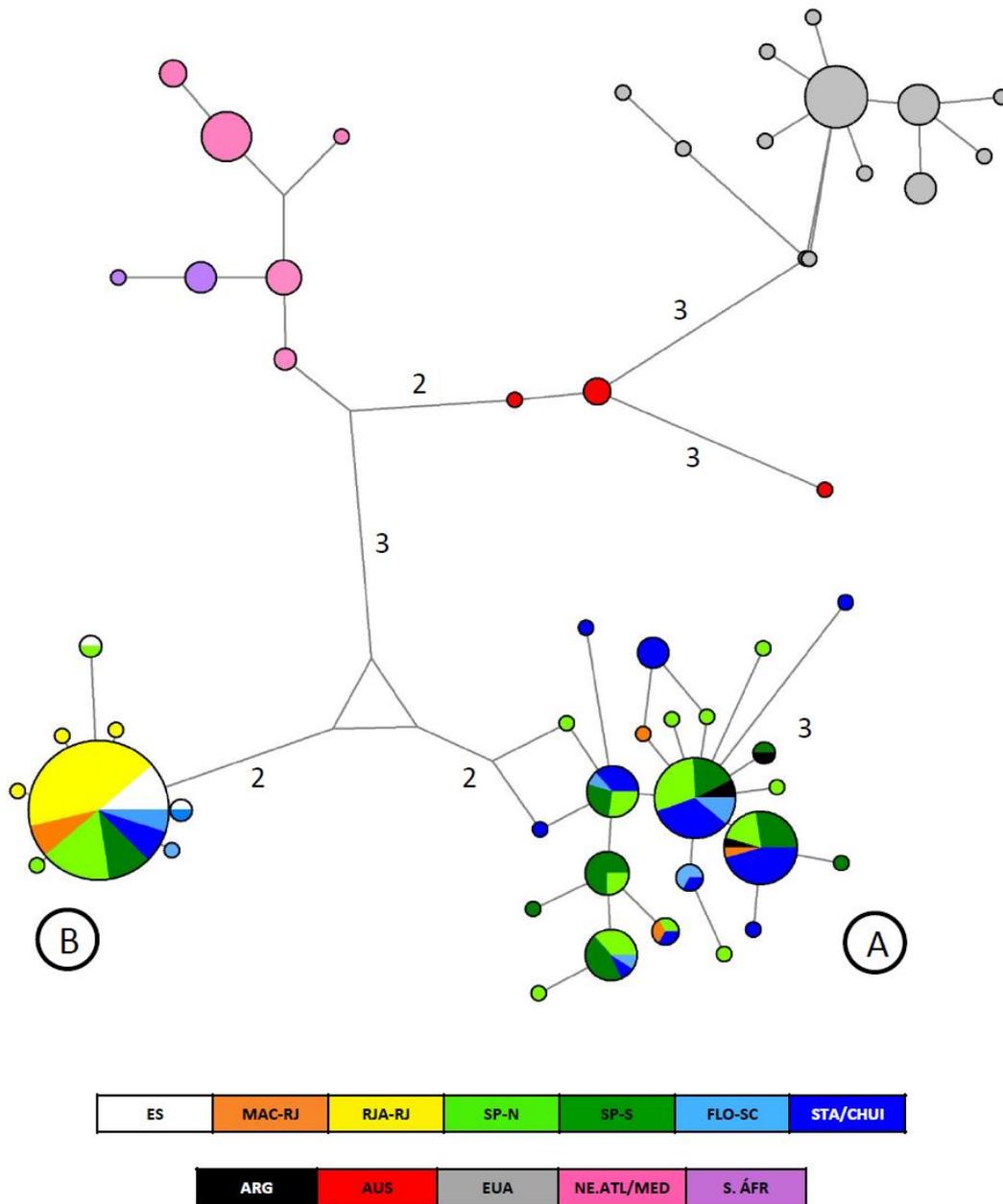


Figura 9) Rede haplotípica do marcador COI. Cada círculo representa um haplótipo, com o tamanho proporcional a frequência apresentada. As cores indicam a localidade de procedência conforme a legenda. A e B indicam os grupos de alelos distintos observados para as amostras de Brasil e Argentina. As siglas estão de acordo com a Tabela 1 e Tabela 3.

A rede do marcador rodopsina mostrou uma topologia bem mais simples do que dos genes mitocondriais. Foram reconstruídos três haplótipos como mais frequentes. Um único haplótipo foi compartilhado entre as amostras dos EUA e NE.ATL/MED. As amostras do Brasil se dividiram em dois haplótipos mais frequentes e um terceiro com uma frequência baixa. O mesmo padrão observado nas amostras dos marcadores

mitocondriais se repete no marcador nuclear. Esse padrão observado será mais aprofundado no item 4.3 (comparação entre os marcadores). Um ponto importante apresentado na rede foi à distância entre os haplótipos mais frequentes do Brasil ser maior (distância $p=1\%$) que a distância entre os haplótipos do Brasil com EUA e NE.ATL/MED. A distância entre os grupos A' e B', apesar de ser um marcador nuclear, é equivalente ao obtido para os marcadores mitocondriais.

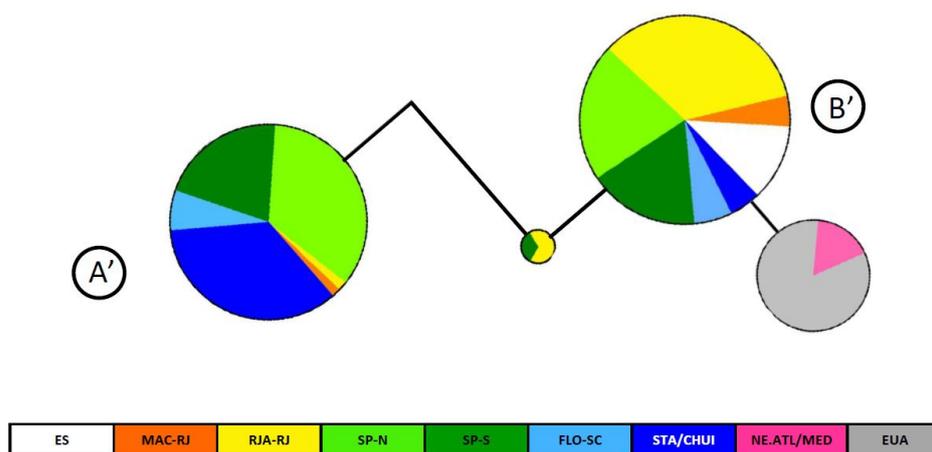
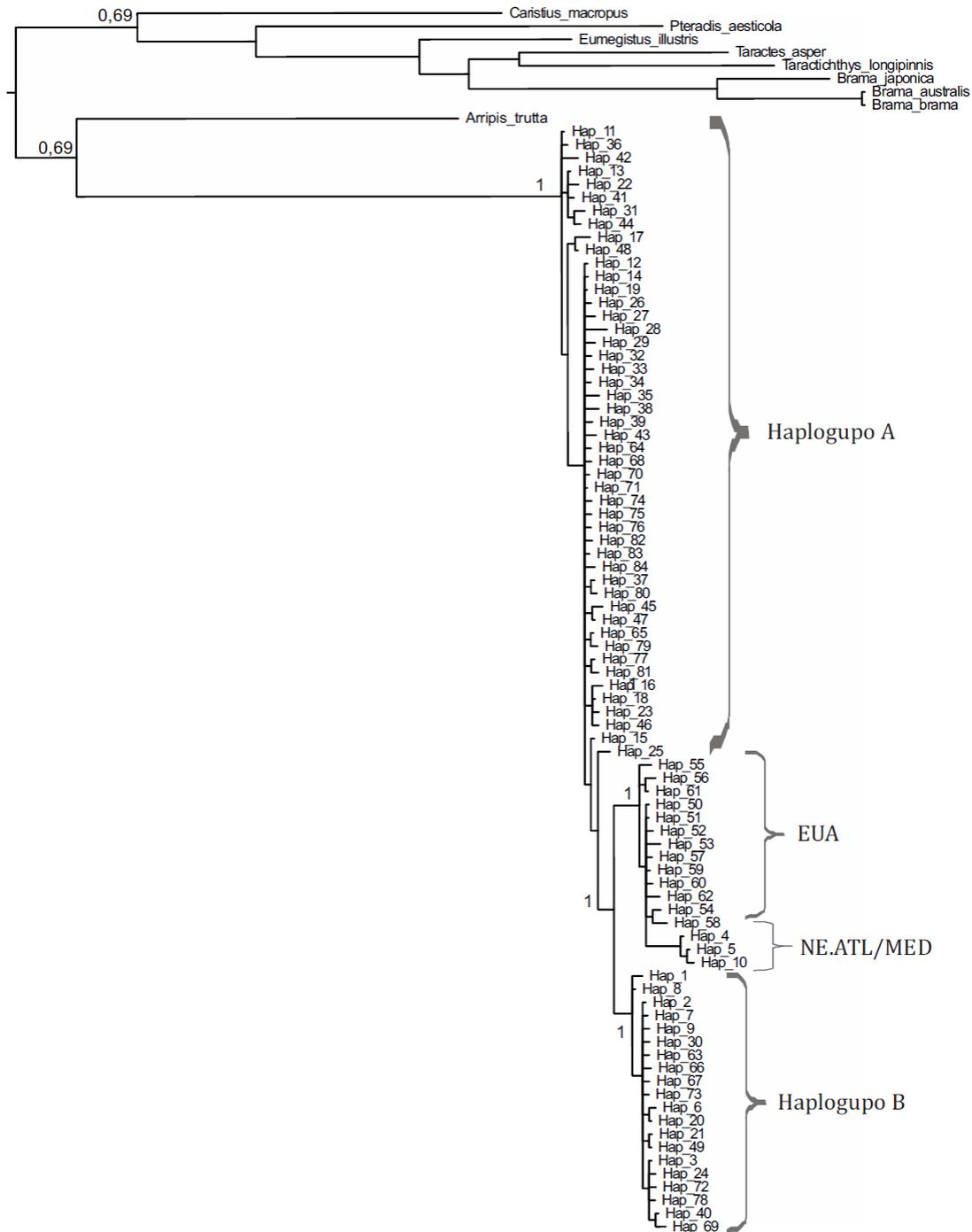


Figura 10) Rede haplotípica do marcador rodopsina. Cada círculo representa um haplótipo, com o tamanho proporcional a freqüência apresentada. As cores indicam a localidade de procedência conforme a legenda. A' e B' são os haplótipos mais frequentes encontrados no Brasil. As siglas estão de acordo com a Tabela 1 e Tabela 3.

Filogenias

A análise filogenética do gene *cit b* foi realizado com o modelo evolutivo HKY (Hasegawa *et al.* 1989) utilizando estimativa de sítios invariantes (I) e distribuição gamma (G), melhor modelo evolutivo indicado para os dados. A espécie apresentou monofiletismo sustentado por probabilidade posterior igual a um. Dentro da espécie foram reconstruídos dois grupos também bem suportados (probabilidade posterior=1) (Figura 11) Arvore Bayesiana do gene citocromo b da espécie *P. saltatrix*. Estes grupos foram: um com os haplótipos da costa atlântica dos Estados Unidos (EUA) e amostras provenientes da costa da Europa e Mar mediterrâneo (NE. ATL/MED); e outro com parte dos haplótipos do Brasil, denominados já na rede haplotípica como Haplogrupo B. Esse foi composto por haplótipos mais frequentes da região mais ao norte da distribuição (Espírito Santo, Macaé - RJ e Rio de Janeiro - RJ), mas também haplótipos comuns nas amostragens intermediárias (Litoral norte e sul de São Paulo e Florianópolis - SC). Os demais haplótipos do Brasil se alocaram na base dos dois clados, a maior parte de suas linhagens aparecem em um politomia de posição derivada formando um grupo parafilético, nomeado na rede

haplotípica como haplogrupo A. Este grupo foi composto por haplótipos mais frequentes da região ao sul da distribuição (STA/CHUI) e também por haplótipos comuns nas regiões intermediárias (SP-N, SP-S e FLO-SC).



03

Figura 11) Arvore Bayesiana do gene citocromo b da espécie *P. saltatrix*. O modelo evolutivo utilizado foi HKY+I+G. Os números compreendem a probabilidade posterior de suporte dos ramos. As siglas são referentes a localidades na Tabela 1 e Tabela 3. Haplogrupo A e B são referentes a Figura 8 (Rede haplotípica cit b).

Os dados do marcador citocromo oxidase I apontaram como melhor modelo evolutivo HKY (Hasegawa *et al.* 1989) utilizando estimativa de sítios invariantes (I) e distribuição gamma (G) (mesmo do marcador citocromo b) (Figura 12). Somente alguns dos valores de probabilidade posterior foram altos suficientes (acima de 90%) para considerar um valor de suporte significativo entre os grupos de *P. saltatrix* do mundo. Esses valores foram colocados entre parênteses. Um dos grupos juntou haplótipos de NE. ATL/MED aos da Austrália, formando um grupo monofilético (0,99). O grupo mais próximo a este foi o que reuniu haplótipos compartilhados entre EUA e CANADÁ (1), com haplótipos em parafiletismo de AF. SUL, formando um clado monofilético (0,91). Os haplótipos provindos do Brasil se dividiram em dois Haplogrupos. Um grupo (B) com o haplótipo mais frequente das regiões mais ao norte (ES, MAC-RJ e RJA-RJ) e comum na região intermediária (São Paulo Norte e Sul, e FLO-SC) que se mostrou basal em relação os clados da espécie. O outro grupo (A) reuniu haplótipos comuns no litoral norte e sul de São Paulo e os haplótipos mais frequentes da região sul (STA/CHUÍ) que são os mesmos encontrados na Argentina. Essa ultima localidade apresentou somente haplótipos compartilhados com os do Brasil. A disposição desses clado com relação as demais foi pouco suportada (0,55) assim como sua própria sustentação (0,57).

Para o gene nuclear da rodopsina, o melhor modelo evolutivo que explicou os dados foi o Jukes Cantor (Jukes e Cantor 1969) (Figura 13). Os haplótipos do Brasil não se mostraram como um grupo monofilético. O haplótipo 1 foi o único encontrado tanto em EUA quanto nas sequências de NE. ATL/MED que se juntaram ao haplótipo 3 do Brasil suportado por um valor de probabilidade posterior de 0,65. Esse haplótipo (3) foi o mais frequente observado nas sequências da região mais ao norte (ES, MAC-RJ e RJA-RJ) assim como o haplótipo 4 nas regiões mais ao sul da distribuição (STA/CHUÍ). O haplótipo 2 só foi observado em dois indivíduos, um de RJA-RJ e outro de SP-S-PRI. A espécie *Pomatomus saltatrix* se juntou a uma espécie da família Arripidae com probabilidade posterior igual a 1. A topologia da Filogenia da rodopsina é similar ao padrão observado no gene citocromo b.

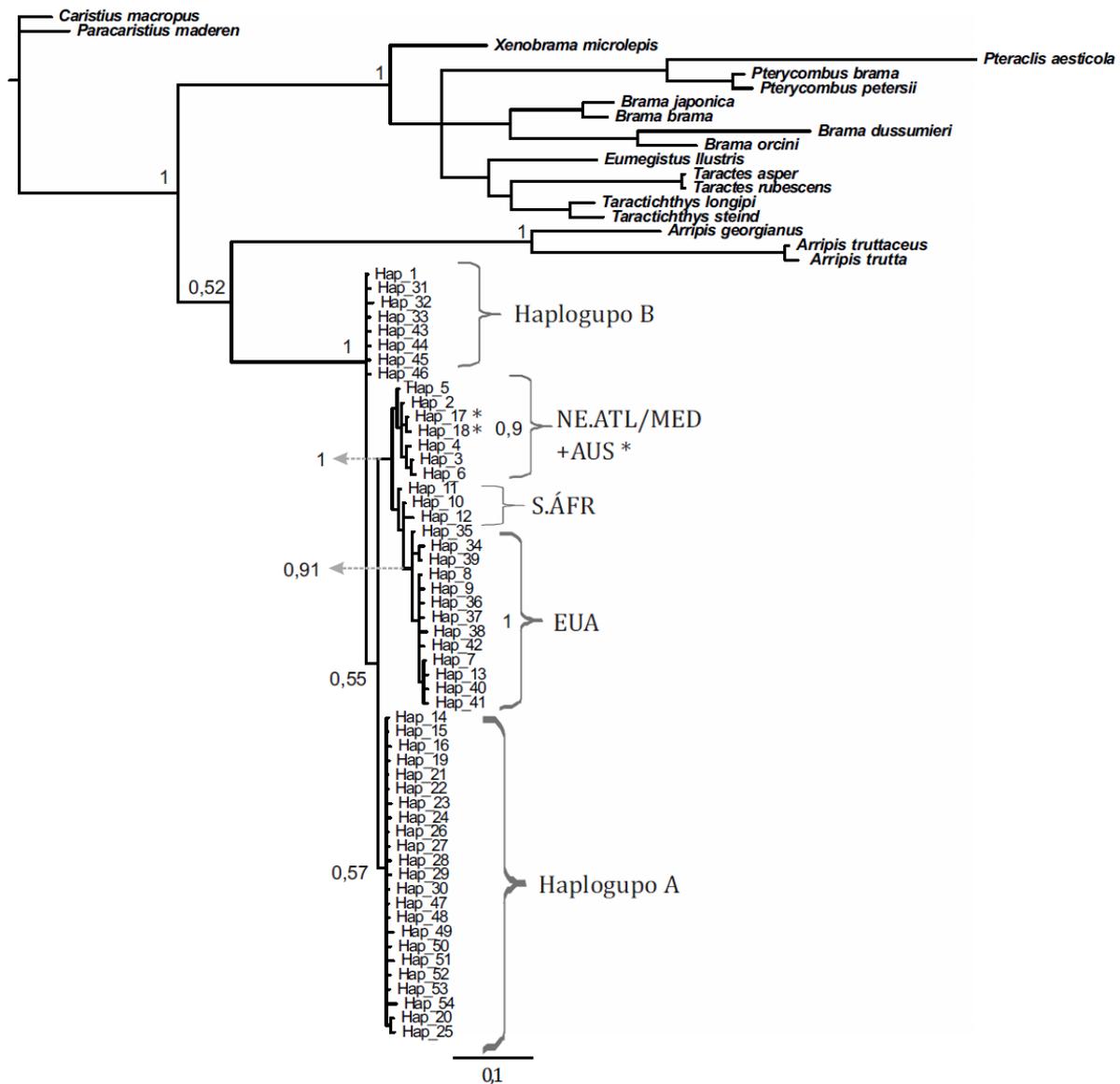


Figura 12) Análise bayesiana do gene citocromo oxidase I para *P. saltatrix*. O modelo evolutivo utilizado foi HKY+I+G. O símbolo * representa os haplótipos da Austrália dentro de um clado maior. Os números compreendem a probabilidade posterior de suporte dos ramos. Siglas são referentes a localidades da Tabela 1 e Tabela 3. Haplogrupo A e B são referentes à Figura 8 (Rede haplotípica COI - Figura 9).

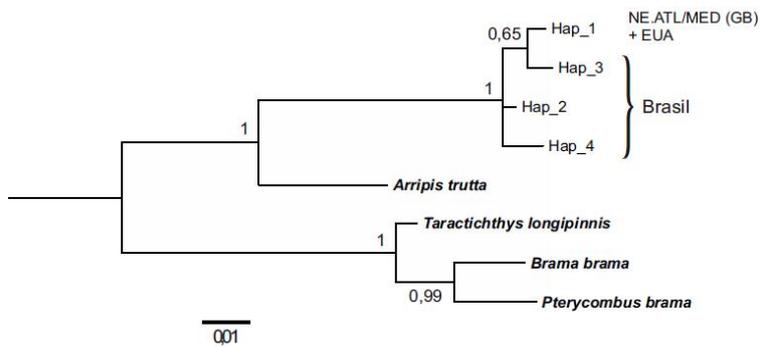


Figura 13) Análise Bayesiana do gene rodopsina para *P. saltatrix*. O modelo evolutivo utilizado foi Kimura 2-parâmetros (K2P). Os números compreendem a probabilidade posterior de suporte dos ramos. Siglas são referentes a localidades da Tabela 1 e Tabela 3.

Análises de Delimitação de espécies

A análise ABGD reconstruiu uma topologia de distâncias (Figura 14, nº 1 e 2) pelo modelo evolutivo Jukes-Cantor (Jukes e Cantor 1969) em ambos marcadores mitocondriais. As distâncias foram contadas (Figura 14, nº 3 e 4) e ranqueadas (Figura 14, nº 5 e 6). Nos gráficos de ranqueamento, uma diminuição da inflexão da curva pode ser caracterizada por mudança de distância intra específica para inter específica como apontado em Puillandre *et al.* (2012). O gráfico final (Figura 14, nº7) é o que define quantos grupos existem baseados em pré-requisitos de distâncias. Baseado em diferentes taxas *P* esse detectou hipóteses distintas nos diferentes marcadores. Para o marcador citocromo oxidase I, utilizando uma taxa *P* de até 2%, foram detectados três grupos: Haplogrupo A, Haplogrupo B, e todas as outras localidades. E para o marcador cit b, utilizando a taxa de até 3%, foram detectados também três grupos: Brasil (Haplogrupo A e B), EUA, e NE.ATL/MED.

Os valores de suporte adicionados pelo método Bayesiano (bPTP) nas arvores previamente geradas para o marcador cit b e COI foram baixos dentro das linhagens de *P. saltatrix* colocando todas as amostras desse trabalho e sequências do *GenBank* como uma única espécie. No entanto os testes também não reconheceram algumas espécies do grupo externo de um mesmo gênero como diferentes espécies, ou seja, o teste foi bastante conservador. Com uma taxa de reconhecimento de 0,018 (cit b) e 0,126 (COI). As arvores anotadas podem ser consultadas em anexos III e IV.

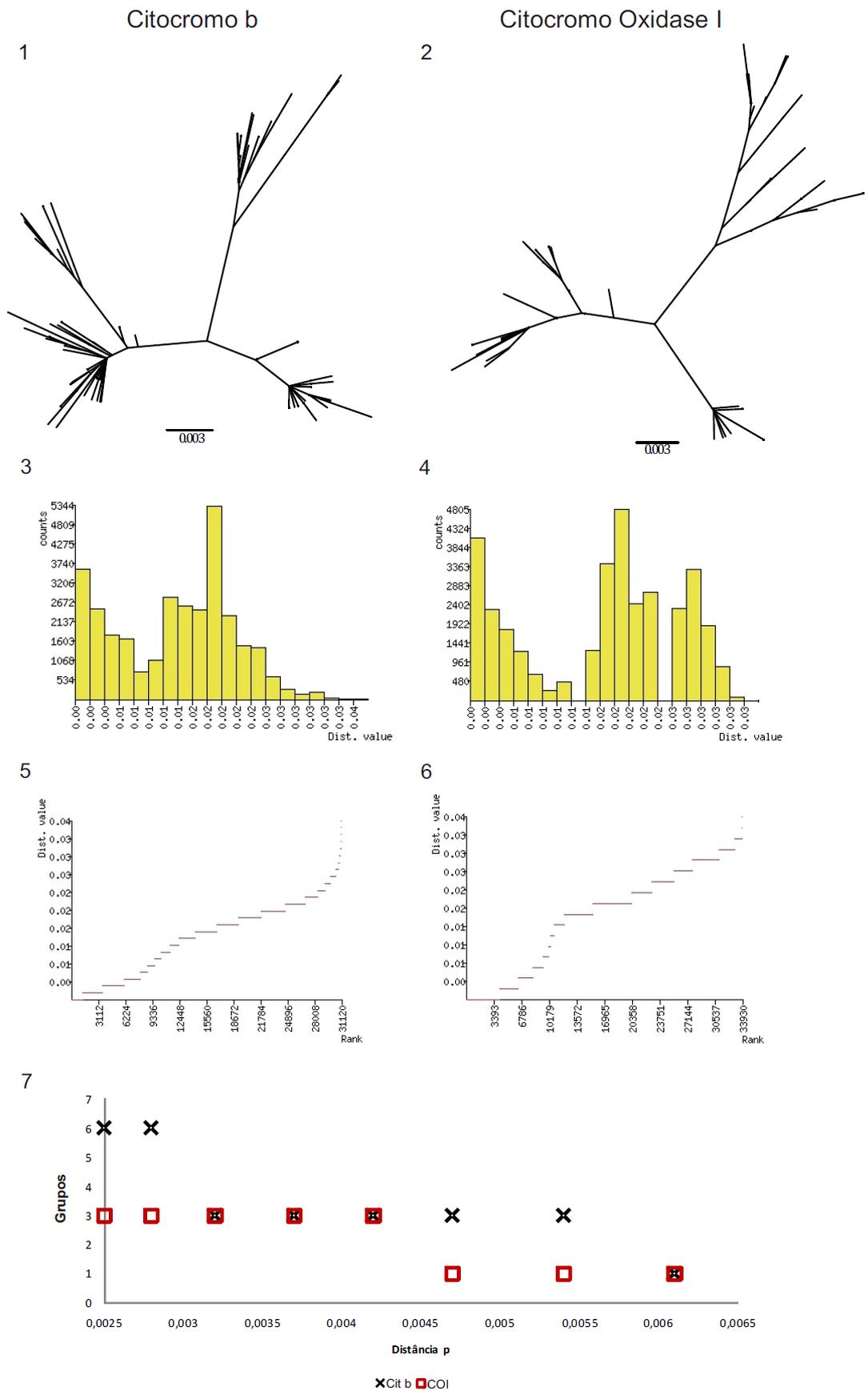


Figura 14) Resultados gerados na análise ABGD online. Na primeira coluna estão os resultados do marcador citocromo b, e na segunda do marcador citocromo oxidase I. Os

Gráficos 1 e 2 são a reconstrução das distâncias gênicas entre os táxons terminais pelo modelo Juques Cantor. 3 e 4 representam a contagem das distâncias pelos seus valores. Os gráficos 5 e 6 são o ranqueamento das distâncias. E o gráfico 7 é o que infere o número de grupos baseado em *priors* de distância como limite entre os grupos.

4.1.3 Análises de Estruturação Populacional

As comparações do índice ϕ_{ST} par a par para todos os genes analisados mostraram resultados em geral similares entre eles (Tabela 7, Tabela 8 e

Tabela 9). Os dois marcadores de origem mitocondrial mostraram estruturação entre todas as regiões continentais. Para o gene nuclear, também foi encontrada estruturação das amostragens do Brasil com outros continentes. No entanto, nesse mesmo gene não foi obtido valor significativo comparando EUA com NE. ATL/MED.

Entre as amostragens sazonais do litoral de São Paulo (área tracejada nas tabelas ϕ_{ST}), os resultados foram bem similares entre o gene citocromo b e rodopsina. Nesses marcadores, a amostragem SP-N-OTN se diferenciou de todas as outras com valores entre 0,21 a 0,79. As maiores diferenciações nos dois marcadores foram referentes à comparação de SP-N-OTN com SP-S-INV. Essa mesma comparação no gene COI também foi significativa, com um valor de ϕ_{ST} de 0,65. As outras comparações não obtiveram valores significativos para cit b e rodopsina. Em relação às demais amostragens do Brasil, para todos os marcadores, SP-N-OTN não apresentou valores significativos em nenhum gene em relação à ES, MAC-RJ e RJA-RJ. Por outro lado, mostrou-se estruturado em relação a STA/CHUI em todos marcadores e a FLO-SC em cit b e rodopsina. As outras comparações podem ser consultadas nas Tabela 7, Tabela 8 e

Tabela 9.

Como um padrão geral observado, ES, MAC-RJ, RJA-RJ e SP-N-OTN parecem formar um grupo coeso, sendo MAC-RJ uma localidade um pouco mais diferenciada. As outras coletas de norte e sul de São Paulo se assemelham entre si e com FLO-SC, no entanto SP-S-INV mostra se um pouco mais distinta, agrupando-se ao extremo sul da distribuição STA/CHUI.

Tabela 7) Valores de ϕ_{ST} par a par do gene **citocromo b**. A região em destaque se caracteriza pelas comparações entre as amostragens locais e sazonais do litoral de São Paulo. Valores significativos após correção pelo método FDR encontram se apontados com *. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1 e Tabela 3.

	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/ CHUI	EUA
ES											
MAC-RJ	0,07										
RJA-RJ	0,00	0,11*									
SP-N-OTN	0,00	0,00	0,00	SP							
SP-N-PRI	0,35*	0,17*	0,44*	0,27*							
SP-N-INV	0,38*	0,17*	0,47*	0,29*	-0,03						
SP-S-PRI	0,39*	0,19*	0,46*	0,30*	-0,02	-0,02					
SP-S-INV	0,73*	0,50*	0,77*	0,64*	0,06	0,08	0,06				
FLO-SC	0,37*	0,09	0,46*	0,24*	0,00	-0,01	0,01	0,19*			
STA/CHUI	0,61*	0,41*	0,65*	0,53*	0,07*	0,06	0,05*	0,06	0,10*		
EUA	0,83*	0,76*	0,84*	0,80*	0,64*	0,67*	0,66*	0,79*	0,71*	0,74*	
NE. ATL/MED	0,92*	0,81*	0,90*	0,87*	0,66*	0,69*	0,68*	0,84*	0,73*	0,79*	0,81*

Tabela 8) Valores de ϕ_{ST} par a par do gene **citocromo oxidase I**. A região em destaque se caracteriza pelas comparações entre as amostragens locais e sazonais do litoral de São Paulo. Valores significativos após correção pelo método FDR encontram se apontados com *. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1 e Tabela 3.

	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/ CHUI	ARG	EUA	NE. ATL/ MED	S. AFR
ES														
MAC-RJ	0,21													
RJA-RJ	0,05	0,45*												
SP-N-OTN	0,11	-0,13	0,37	SP										
SP-N-PRI	0,55*	0,19*	0,68*	0,30*										
SP-N-INV	0,55*	0,15	0,72*	0,26	-0,04									
SP-S-PRI	0,37*	-0,02	0,56*	0,05	0,04	0,03								
SP-S-INV	0,84*	0,48*	0,92*	0,65*	0,08	0,06	0,27*							
FLO-SC	0,40*	-0,02	0,61*	0,05	0,02	0,00	-0,06	0,26*						
STA/CHUI	0,64*	0,32*	0,74*	0,44*	0,04	0,02	0,15*	0,02	0,14*					
ARG	0,93*	0,46	0,97*	0,68*	0,11	0,07	0,25*	0,04	0,24	-0,03				
EUA	0,90*	0,82*	0,93*	0,86*	0,77*	0,78*	0,79*	0,86*	0,79*	0,79*	0,88*			
NE. ATL/MED	0,89*	0,77*	0,94*	0,82*	0,73*	0,74*	0,72*	0,85*	0,74*	0,76*	0,88*	0,79*		
S.AFR	0,92*	0,66*	0,97*	0,77*	0,65*	0,62*	0,62*	0,82*	0,62*	0,71*	0,88*	0,74*	0,78*	
AUS	0,95*	0,71*	0,98*	0,83*	0,69*	0,67*	0,66*	0,86*	0,67*	0,73*	0,94*	0,84*	0,55*	0,85*

Tabela 9) Valores de ϕ_{ST} par a par do gene **rodopsina**. A região em destaque se caracteriza pelas comparações entre as amostragens locais e sazonais do litoral de São Paulo. Valores significativos após correção pelo método FDR encontram se apontados com *. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1 e Tabela 3.

	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/ CHUI	EUA
ES											
MAC-RJ	0,28										
RJA-RJ	0,01	0,18									
SP-N-OTN	0,13	-0,04	0,02								
SP-N-PRI	0,59*	0,28*	0,60*	0,41*							
SP-N-INV	0,69*	0,34*	0,70*	0,48*	-0,02						
SP-S-PRI	0,40*	0,09	0,41*	0,21*	0,04	0,07					
SP-S-INV	1,00*	0,65*	0,90*	0,79*	0,13	0,10	0,29				
FLO-SC	0,51*	0,10*	0,53	0,24*	0,02	0,04	-0,03	0,28			
STA/CHUI	0,83*	0,63*	0,81*	0,72*	0,10*	0,06	0,27*	-0,02	0,28*		
EUA	0,98*	0,75*	0,83*	0,81*	0,60*	0,73*	0,48*	0,98*	0,63*	0,81*	
NE.ATL/MED	1,00*	0,51*	0,77*	0,63*	0,47*	0,55*	0,35*	1,00*	0,41*	0,74*	-0,04

AMOVA

A Análise de Variância Molecular para o marcador citocromo b mostrou os mais altos valores de ϕ_{CT} na hipótese de estruturação 8 (Tabela 8). Essa hipótese explica 54,2% da variação entre grupos (com variação não significativa dentro dos mesmos), e indica três populações de Anchovas no Brasil. Outros dois cenários de estruturação (hipótese 6 e 7) também tiveram valores levemente inferiores de ϕ_{CT} (0.541 e 0.529 respectivamente) com ϕ_{SC} não significativo, e não podem ser excluídos. A diferença entre os três cenários é em relação ao agrupamento com a população de STA/CHUI, que se junta com Florianópolis (hipótese 7), com SP-S-INV (hipótese 8) ou com nenhuma outra população (hipótese 6). A hipótese mais provável (hipótese 8) foi testada também considerando-se apenas as amostras do Brasil, obtendo-se índices de $\phi_{CT} = 0,351$ ($p < 0,001$) e de $\phi_{SC} = 0$ ($p > 0,509$). As amostragens que se agrupam nas regiões mais ao sul não se apresentam como as mais próximas geograficamente entre si revelando um cenário de estruturação mais complexo, que varia pela sazonalidade das amostragens. Os valores por hipótese podem ser consultados na Tabela 10.

Tabela 10) Análise de Variância Molecular do gene mitocondrial **citocromo b**. Diferentes hipóteses (H) de estruturação testadas com seus respectivos valores de componentes de variação e valores de p de cada índice. Os valores destacados sugerem as hipóteses mais prováveis. As cores iguais representam o agrupamento testado composto pelas amostragens do Brasil referentes na Tabela 1 e Sequência do *GenBank* (Tabela 3).

H	Agrupamentos						ϕ_{SC}	ϕ_{ST}	ϕ_{CT}
							p	p	p
1	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,334	0,677	0,515
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,013
2	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,299	0,692	0,561
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,013
3	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,112	0,601	0,551
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,000
4	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,034	0,597	0,583
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,024	0,000	0,000
5	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,036	0,585	0,570
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,043	0,000	0,000
6	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,012	0,547	0,541
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,275	0,000	0,000
7	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,020	0,538	0,529
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,116	0,000	0,000
8	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	-0,002	0,541	0,542
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,509	0,000	0,000
9	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,020	0,533	0,524
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,094	0,000	0,000

A mesma hipótese de estruturação entre as amostras do Brasil se mostrou como a mais provável para também os outros dois genes. Para o marcador COI (Tabela 11), duas hipóteses (8 e 10) obtiveram valores iguais e de variação entre os grupos formados (68,5%). Nesse marcador, as sequências da Argentina puderam ser analisadas e essas se agrupam ao sul do Brasil. A diferença entre as duas hipóteses é o agrupamento das amostras de Macaé com Norte de São Paulo - Outono na hipótese 10. A outra hipótese é a mesma que havia sido detectada na análise com sequência de citocromo b. Se considerarmos apenas as amostragens do Brasil, as mesmas configurações de estruturação obtiveram valores de ϕ_{CT} igual a 44,3% (p 0,001) e ϕ_{SC} de 0.

Tabela 11) Análise de Variância Molecular do gene mitocondrial **citocromo oxidase I**. Diferentes hipóteses (H) de estruturação testadas com seus respectivos valores de componentes de variação e valores de p de cada índice. Os valores destacados sugerem as hipóteses mais prováveis. As cores iguais representam o agrupamento testado composto pelas amostragens do Brasil referentes na Tabela 1 e Sequência do *GenBank* (Tabela 3).

H	Agrupamentos								ϕ_{SC}	ϕ_{ST}	ϕ_{CT}
									<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
1	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,508	0,774	0,541
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,000	0,000	0,001
2	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,436	0,777	0,605
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,000	0,000	0,000
3	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,150	0,735	0,688
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,000	0,000	0,000
4	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,108	0,733	0,701
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,002	0,000	0,000
5	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,103	0,729	0,698
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,002	0,000	0,000
6	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,091	0,703	0,674
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,013	0,000	0,000
7	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,119	0,700	0,659
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,002	0,000	0,000
8	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,050	0,701	0,685
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,084	0,000	0,000
9	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,062	0,700	0,681
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,039	0,000	0,000
10	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	NE,ATL/MED	AF, SUL	0,034	0,696	0,685
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	ARG	AUS		0,274	0,000	0,000

Os componentes de variância do marcador rodopsina também apresentaram como hipótese mais provável (explicando 53,3% da variação entre grupos, sem diferenciação significativa dentro dos grupos) a mesma observada nos dois marcadores mitocondriais (Hipótese 7) (Tabela 12). Nesse gene, EUA e NE. ATL/MED foram associadas já que nenhuma variância pôde ser observada entre essas localidades nesse marcador. O mesmo índice explicou 47,8% da variação entre grupos quando analisadas somente as amostragens do Brasil para a mesma hipótese.

Tabela 12) Análise de Variância Molecular do gene nuclear **rodopsina**. Diferentes hipóteses (H) de estruturação testadas com seus respectivos valores de componentes de variação e valores de p de cada índice. Os valores destacados sugerem as hipóteses mais prováveis. As cores iguais representam o agrupamento testado composto pelas amostragens do Brasil referentes na Tabela 1 e Sequência do *GenBank* (Tabela 3).

H	Agrupamentos						ϕ_{SC}	ϕ_{ST}	ϕ_{CT}
							<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
1	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,449	0,586	0,249
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,042
2	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,198	0,594	0,494
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,000
3	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,123	0,596	0,539
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,000
4	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,125	0,587	0,528
	RJA-RJ	SP-N-OUT	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,000
5	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,061	0,550	0,521
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,022	0,000	0,000
6	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,185	0,539	0,434
	RJA-RJ	SP-N-OUT	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,000	0,000	0,002
7	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,036	0,549	0,533
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,054	0,000	0,000
8	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,037	0,543	0,525
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI	NE.ATL/MED	0,037	0,000	0,000

Considerando-se o conjunto das análises com sequências dos dois marcadores mitocondriais (cit b e COI) e do marcador nuclear (rodopsina), portanto, escolhemos como grupamento mais provável para as populações brasileiras aquele que junta as populações em três grupos: o primeiro inclui amostras do Espírito Santo, Macaé e Rio de Janeiro com as amostras do norte de São Paulo no outono; o segundo une amostras de São Paulo Norte na primavera e inverno e de Florianópolis o terceiro une a amostra de São Paulo Sul do Inverno com a amostra de Santa Marta ao Chuí.

4.2 Microssatélites

Foram amplificados com êxito inicialmente 8 *loci* de microssatélites descritos para a espécie *Pomatomus saltatrix*. Os marcadores ELF44 e ELF50 foram retirados das análises por apresentarem ampliações inespecíficas que levaram a problemas na determinação

de alelos em mais de 50% dos indivíduos. Para os outros seis marcadores, os números de alelos obtidos, faixa de tamanho, heterozigosidades e fluoróforo utilizado podem ser consultados na Tabela 13. O número de alelos total variou entre 22 (ELF 49) e 57 (ELF 39) e a heterozigosidade total observada *multilocus* foi de 0,75 enquanto que a esperada foi de 0,94. Com as amostragens somente do Brasil foram obtidos índices de $H_o=0,76$ e $H_e=0,93$. Dentre todas as amostragens locais, somente ES e MAC-RJ não apresentaram desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nos resultados *multilocus* quando nas análises uniloculares. Nas outras localidades, em quase todos os casos onde houve desequilíbrio HW, o teste de déficit de heterozigotos também foi significativo.

Tabela 13) Resumo de índices obtidos para todos os marcadores pelas localidades. O número de indivíduos amplificados (N) o número de alelos observados (N_a), a faixa de tamanho dos alelos. Além de os valores de Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p_{HWE}) e de déficit de heterozigotos (p_{D-He}). Os valores com * são aqueles significativos após a correção FDR para a significância de 0,05. As células em destaque apresentaram valores de H_o menores do que a metade de H_e . As siglas por localidade correspondem a Tabela 1.

		ELF17	ELF19	ELF37	ELF39	ELF46	ELF49	Total
ES	N	11	11	10	8	10	11	
	N_a	13	13	11	10	10	8	
	Tamanho (pb)	164-244	243-299	257-317	414-458	191-291	183-211	
	H_o	0,91	0,82	0,80	0,88	0,90	0,82	0,85
	H_e	0,94	0,94	0,94	0,96	0,93	0,86	0,93
	p_{HWE}	0,71	0,06	0,22	0,40	0,71	0,76	0,49
MAC-RJ	N	22	21	22	17	21	22	
	N_a	19	14	17	19	14	13	
	Tamanho (pb)	132-280	231-291	217-329	414-498	255-327	167-223	
	H_o	0,86	0,90	0,95	0,94	0,71	0,86	0,87
	H_e	0,95	0,93	0,92	0,96	0,90	0,91	0,92
	p_{HWE}	0,28	0,08	1,00	0,78	0,02	0,53	0,14
RJA-RJ	N	34	32	34	34	34	34	
	N_a	24	17	18	22	17	14	
	Tamanho (pb)	156-276	231-295	237-321	416-484	195-343	167-235	
	H_o	0,85	0,75	0,74	0,91	0,76	0,91	0,82
	H_e	0,95	0,93	0,94	0,94	0,92	0,89	0,93
	p_{HWE}	0,00*	0,00*	0,00*	0,45	0,11	0,70	0,00*
SP-N-OTN	N	9	8	9	3	9	9	
	N_a	13	6	11	6	8	10	
	Tamanho (pb)	136-264	231-335	205-265	426-510	251-327	171-247	
	H_o	0,67	0,25	0,56	1,00	0,33	0,89	0,57
	H_e	0,99	0,89	0,97	1,00	0,96	0,92	0,95
	p_{HWE}	0,01*	0,00*	0,00*	1,00	0,00*	0,73	0,00*
SP-N-PRI	N	30	31	31	31	30	32	
	N_a	20	20	20	26	15	18	
	Tamanho (pb)	160-264	227-347	233-357	418-530	239-303	159-227	
	H_o	0,90	0,58	0,81	0,39	0,50	0,78	0,66
	H_e	0,95	0,95	0,94	0,98	0,90	0,93	0,94

		p_{HWE}	0,00*	0,00*	0,01*	0,00*	0,02*	0,00*	0,00*
		p_{D-He}	0,09*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
			ELF17	ELF19	ELF37	ELF39	ELF46	ELF49	Total
SP-N-INV	N	22	22	22	17	19	22		
	N_a	22	17	13	24	14	12		
	Tamanho (pb)	156-260	235-327	257-321	418-520	263-335	159-227		
	H_o	1,00	0,64	0,77	0,71	0,53	0,86	0,76	
	H_e	0,96	0,94	0,91	0,99	0,95	0,90	0,941	
	p_{HWE}	0,77	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,09	0,00*	
	p_{D-He}	-	0,00*	0,10	0,00*	0,00*	-	0,00*	
SP-S-PRI	N	39	38	37	26	36	37		
	N_a	25	20	22	23	21	14		
	Tamanho (pb)	171-215	144-268	203-339	418-530	243-343	159-219		
	H_o	0,92	0,68	0,65	0,62	0,56	0,70	0,69	
	H_e	0,95	0,93	0,94	0,94	0,93	0,90	0,93	
	p_{HWE}	0,31	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	
	p_{D-He}	-	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	
SP-S-INV	N	12	11	12	10	12	12		
	N_a	13	16	15	12	10	13		
	Tamanho (pb)	160-28	235-339	241-345	434-520	255-323	179-239		
	H_o	0,92	0,91	0,83	0,60	0,58	0,75	0,77	
	H_e	0,93	0,97	0,95	0,97	0,90	0,94	0,94	
	p_{HWE}	0,83	0,45	0,20	0,00*	0,02*	0,14	0,00*	
	p_{D-He}	-	-	-	0,00*	0,01*	-	0,00*	
FLO-SC	N	13	13	13	12	13	13		
	N_a	16	16	11	15	8	10		
	Tamanho (pb)	160-256	231-335	245-313	418-532	271-299	183-239		
	H_o	1,00	0,62	0,54	0,75	0,62	0,92	0,74	
	H_e	0,93	0,96	0,93	0,95	0,85	0,89	0,92	
	p_{HWE}	1,00	0,00*	0,00*	0,00*	0,01*	0,60	0,00*	
	p_{D-He}	-	0,00*	0,00*	0,03*	0,07	-	0,00*	
STA/CHUI	N	40	39	40	40	39	40		
	N_a	23	27	21	32	20	18		
	Tamanho (pb)	132-260	227-355	241-349	418-524	251-351	171-247		
	H_o	0,90	0,54	0,85	0,63	0,69	0,93	0,76	
	H_e	0,95	0,97	0,94	0,97	0,92	0,93	0,95	
	p_{HWE}	0,02*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,37	0,00*	
	p_{D-He}	0,05	0,00*	0,04*	0,00*	0,00*	-	0,00*	
BRASIL	N	232	226	230	198	223	232		
	N_a	36	34	35	57	31	22		
	Tamanho (pb)	132-280	203-327	205-329	414-532	191-351	159-247		
	H_o	0,90	0,67	0,77	0,69	0,63	0,84	0,75	
	H_e	0,96	0,96	0,94	0,98	0,92	0,92	0,94	
	p_{HWE}	0,17	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	
	p_{D-He}	-	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	
EUA	N	30	30	30	30	25	30		
	N_a	11	16	18	20	15	13		
	Tamanho (pb)	136-232	235-327	245-333	416-504	251-315	171-223		
	H_o	0,53	0,57	0,80	0,97	0,64	0,67	0,70	
	H_e	0,87	0,93	0,94	0,93	0,94	0,90	0,92	
	p_{HWE}	0,00*	0,00*	0,03*	0,76	0,00*	0,03*	0,00*	
	p_{D-He}	0,00*	0,00*	0,01*	-	0,00*	0,00*	0,00*	
TOTAL	N	262	256	260	228	248	262		
	N_a	37	34	36	57	31	22		
	Tamanho (pb)	132-280	203-355	205-365	414-532	191-351	159-247		
	H_o	0,86	0,66	0,77	0,73	0,63	0,82	0,75	
	H_e	0,96	0,96	0,94	0,97	0,92	0,92	0,95	
	p_{HWE}	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	
	p_{D-He}	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	

O teste de desequilíbrio de ligação mostrou valor significativo entre os *loci* ELF 19 x ELF37 dentro da amostragem EUA. Dentro da amostragem do Brasil o valor não foi significativo entre esses *loci*. Alelos nulos foram observados com frequências entre 4% (RJA-RJ em ELF17) a 29% (SP-N-PRI em ELF39). ELF19 e ELF46 foram os *loci* que apresentaram maiores porcentagens de alelos nulos no total (0,15), em relação aos demais, seguidos por ELF39 com 12% de alelos nulos. Na localidade SP-N-OTN não foi possível calcular a porcentagem de alelos nulos devido o baixo tamanho amostral (Tabela 14).

Tabela 14) Porcentagem de alelos nulos observados nos *loci* de microssatélites em *P. saltatrix* por localidade segundo cálculo pelo algoritmo *Brookfield*. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1. Estão marcados os *loci*/localidades iguais aos marcados na Tabela 13. A letra n indica *loci*/localidade onde não foi possível realizar o cálculo de alelos nulos devido baixo tamanho amostral.

Alelos nulos						
	ELF17	ELF19	ELF37	ELF39	ELF46	ELF49
ES	-	-	-	-	-	-
MAC-RJ	-	-	-	-	0,08	-
RJA-RJ	0,04	0,08	0,10	-	0,07	-
SP-N-OTN	n	n	n	n	n	n
SP-N-PRI	-	0,18	0,06	0,29	0,20	0,07
SP-N-INV	-	0,15	-	0,13	0,20	-
SP-S-PRI	-	0,12	0,14	0,16	0,19	0,10
SP-S-INV	-	-	-	0,16	0,14	-
FLO-SC	-	0,16	0,18	-	-	-
STA/CHUI	-	0,21	0,04	0,17	0,11	-
BRASIL	0,03	0,15	0,09	0,14	0,15	0,04
EUA	0,17	0,18	0,06	-	0,14	0,11
TOTAL	0,05	0,15	0,09	0,12	0,15	0,05

4.2.2 Estruturação Populacional

4.2.2.1 Análises de variância inter e intrapopulacional

Os valores de endocruzamento dentro das amostragens (F_{IS}) e de endocruzamento entre as amostragens (F_{ST}) apresentaram diversos resultados significativos após a

correção FDR para a significância de 0,05. Esses foram destacados nas Tabela 15 e Tabela 16. Os valores de F_{IS} não foram significativos para as localidades de ES e MAC-RJ. Valores baixos, mas significativos, de F_{IS} foram observados pra RJA-RJ, e valores de moderados a altos para as outras localidades, chegando a 0,72 em SP-N-OTN no *locus* ELF19 (Tabela 15). Esses parâmetros se refletem também nos resultados *multilocus*, sendo ES e MAC-RJ não significativos e das outras localidades variando de 0,12 no RJA-RJ a 0,36 em SP-N-OTN. Retirando os *loci* com alelos nulos com frequência maior do que 0,15, os desvios nas mesmas localidades continuaram significativos, mas com valores menores do que com o set de dados completos.

Os valores de F_{ST} com dados de microssatélites foram menores que aqueles observados com as sequências de DNA mitocondriais e nucleares, sendo poucos os valores significativos após a correção FDR (Tabela 15) Valores de endocruzamento F_{IS} entre as amostragens de *P. saltatrix*. Na ultima linha, estão os valores do cálculo de F_{IS} *multilocus* sem os *loci* que apresentaram taxa de acima de 15% de alelos nulos (ELF19 e ELF46). O símbolo * aponta valores significativos após correção FDR para valor 0,05. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1. Estão marcados os *loci*/localidades iguais aos marcados na Tabela 13. Note que os três têm os maiores valores de F_{IS} . (Tabela 16). Nenhuma das comparações entre as amostragens do litoral de São Paulo foi significativa. Retirando os dois *loci* com frequência de alelos nulos maiores que 0,15, não houve grandes diferenças entre as análises, somente alguns dos índices deixaram de ser significativos.

A população dos EUA apresentou a maior diferenciação em relação às amostragens do Brasil, com F_{ST} variando de 0,02 (MAC-RJ) a 0,04 e 0,05, ambas em relação à FLO-SC. A única comparação não significativa foi com relação a SP-N-OTN, que tampouco diferiu significativamente de qualquer outra população, provavelmente devido ao seu baixo tamanho amostral. Todas as outras comparações significativas dentro do Brasil não discordaram das comparações significativas para os outros marcadores, mas os valores se mostraram bem menos expressivos.

Tabela 15) Valores de endocruzamento F_{IS} entre as amostragens de *P. saltatrix*. Na ultima linha, estão os valores do cálculo de F_{IS} *multilocus* sem os *loci* que apresentaram taxa de acima de 15% de alelos nulos (ELF19 e ELF46). O símbolo * aponta valores significativos após correção FDR para valor 0,05. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1. Estão marcados os *loci*/localidades iguais aos marcados na Tabela 13. Note que os três têm os maiores valores de F_{IS} .

	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OUT	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/ CHUI	BRASIL	EUA
ELF17	0,03	0,09	0,11*	0,32*	0,05	0,00	0,03	0,01	0,00	0,05	0,06*	0,39*
ELF19	0,13	0,02	0,19*	0,72*	0,39*	0,33*	0,26*	0,06	0,36*	0,44*	0,30*	0,39*
ELF37	0,15	0,00	0,22*	0,43*	0,14*	0,15	0,31*	0,13	0,42*	0,10	0,18*	0,15*
ELF39	0,08	0,02	0,03	0,00	0,60*	0,29*	0,35*	0,38*	0,21*	0,36*	0,29*	0,00
ELF46	0,04	0,20	0,17*	0,65*	0,44*	0,44*	0,41*	0,35*	0,28	0,25*	0,32*	0,32*
ELF49	0,05	0,05	0,00	0,04	0,16*	0,04	0,22*	0,20	0,00	0,00	0,08*	0,26*
<i>Multilocus</i>	0,08	0,06	0,12*	0,36*	0,30*	0,20*	0,26*	0,19*	0,20*	0,20*	0,21*	0,24
Sem ELF 19 e 46	0,08	0,03	0,08*	0,20*	0,24*	0,11*	0,23*	0,18*	0,14*	0,13*	0,16*	0,19*

Tabela 16) Valores de índices de endocruzamento de *P. saltatrix* entre as localidades do Brasil e EUA para marcadores microssatélites. Na diagonal esquerda a análise realizada com todos *loci* e na diagonal direita a mesma análise realizada sem os *loci* ELF19 e ELF46. Os valores significativos após a correção FDR estão destacados com *. As siglas por localidade correspondem a Tabela 1.

FST											
	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/ CHUI	EUA
ES		0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,03*	0,00	0,01	0,03*
MAC_RJ	0,01		0,00	0,00	0,00	0,01	0,02*	0,00	0,02	0,00	0,02*
RJA_RJ	0,00	0,00		0,00	0,01*	0,00	0,00	0,01	0,02*	0,01*	0,04*
SP-N-OTN	0,00	0,00	0,00	SP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SP-N-PRI	0,01	0,01	0,01*	0,00		0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,04*
SP-N-INV	0,01	0,01*	0,00	0,00	0,01		0,01	0,01	0,01	0,00	0,03*
SP-S-PRI	0,01	0,02*	0,00	0,01	0,00	0,01		0,01	0,01	0,00	0,03*
SP-S-INV	0,03*	0,01	0,02*	0,00	0,01	0,01	0,01		0,02	0,00	0,03*
FLO-SC	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02		0,02*	0,05*
STA/CHUI	0,01	0,00	0,01*	0,00	0,01*	0,00	0,00	0,00	0,02*		0,03*
EUA	0,03*	0,02*	0,03*	0,00	0,03*	0,03*	0,03*	0,03*	0,04*	0,03*	

Sem ELF19 e ELF46

Todos Loci

A análise de Variância Molecular (AMOVA) *multilocus* para os microssatélites mostrou valores baixos de F_{CT} (divergência entre os grupos estipulados), mas significativos em algumas hipóteses. Os maiores valores de variância entre os grupos e ao mesmo tempo não significativa dentro dos grupos (F_{SC}) foram observados nas hipóteses 3, 7 e 8. Essas hipóteses dividem as amostragens do Brasil de duas e três populações, sendo

ES, MAC-RJ, RJA-RJ e UBA-SP-OTN como uma população em todas essas hipóteses. Nessas, cerca de 82% da variância observada poderia ser explicada pela divergência individual, e apenas 13% devida à diferenciação entre grupos. Os valores por hipótese podem ser consultados na Tabela 17. A hipótese 7 é equivalente à escolhida nas análises com sequências de DNA tanto de marcadores mitocondriais como nucleares.

Tabela 17) Análise de Variância Molecular *multilocus* para os microssatélites. Diferentes hipóteses (H) de estruturação testadas com seus respectivos valores de componentes de variação e valores de *p* de cada índice. Os valores em negrito sugerem as melhores hipóteses. As cores iguais representam o agrupamento testado composto pelas amostragens do Brasil referentes na Tabela 1 e Sequência do *GenBank* (Tabela 3).

H	Agrupamentos						F _{SC}	F _{ST}	F _{CT}
							p	p	p
1	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,006	0,026	0,0207
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,000	0,000	0,001
2	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,003	0,015	0,012
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,540	0,000	0,003
3	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,003	0,015	0,013
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,654	0,000	0,000
4	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,003	0,014	0,010
	RJA-RJ	SP-N-OUT	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,411	0,000	0,010
5	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,001	0,014	0,012
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,782	0,000	0,002
6	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,003	0,013	0,010
	RJA-RJ	SP-N-OUT	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,642	0,000	0,006
7	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,000	0,013	0,013
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,935	0,000	0,000
8	ES	MAC-RJ	SP-N-PRI	SP-S-PRI	FLO-SC	EUA	0,000	0,013	0,013
	RJA-RJ	SP-N-OTN	SP-N-INV	SP-S-INV	STA/CHUI		0,973	0,000	0,000

4.2.2.2 Análises Bayesianas de atribuição

Foram feitas análises dos dados de microssatélites no programa STRUCTURE, tanto com o pressuposto de frequências não correlacionadas como relaxando-se esse pressuposto. Fizeram-se análises usando-se todas as amostras ou restringindo-se apenas às amostras do Brasil. No caso das análises das populações brasileiras, os dados foram analisados tanto levando-se em conta as localidades de origem como *prior*, como sem levar em conta a origem das amostras.

Análises com todas as amostras, sem *prior* de localidade

No caso de análise de todas as amostras, a melhor hipótese para explicar a distribuição dos genótipos baseando-se nos valores médios de máxima verossimilhança (LnP(D)) (Figura 15, a) particiona as amostras em três populações. Segundo Pritchard *et al.*(2000) o melhor K é aquele que apresenta um grande aumento de LnP(D) com relação ao valor anterior, e após este, se estabelece um platô. No gráfico gerado para esses valores podemos observar esse padrão em dois momentos do gráfico de K. No entanto, o gráfico Delta K, método de Evanno *et al.* (2005) mostrou somente o valor de K igual a três (Figura 15 a). A mesma análise realizada com frequências não correlacionadas obteve um K mais provável de três e dois utilizando ambos os métodos de determinação (Figura 15 b). Nos gráficos de barras de atribuição, vemos que a população dos EUA pode ser claramente distinta das demais (Figura 16) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população considerando o cenário de estruturação: a) três populações, resultado da análise realizada com frequências correlacionadas, a separação entre as amostras brasileiras não teve uma boa resolução, mas podemos observar uma predominância de amostras de localidades mais ao norte da distribuição (Figura 11).

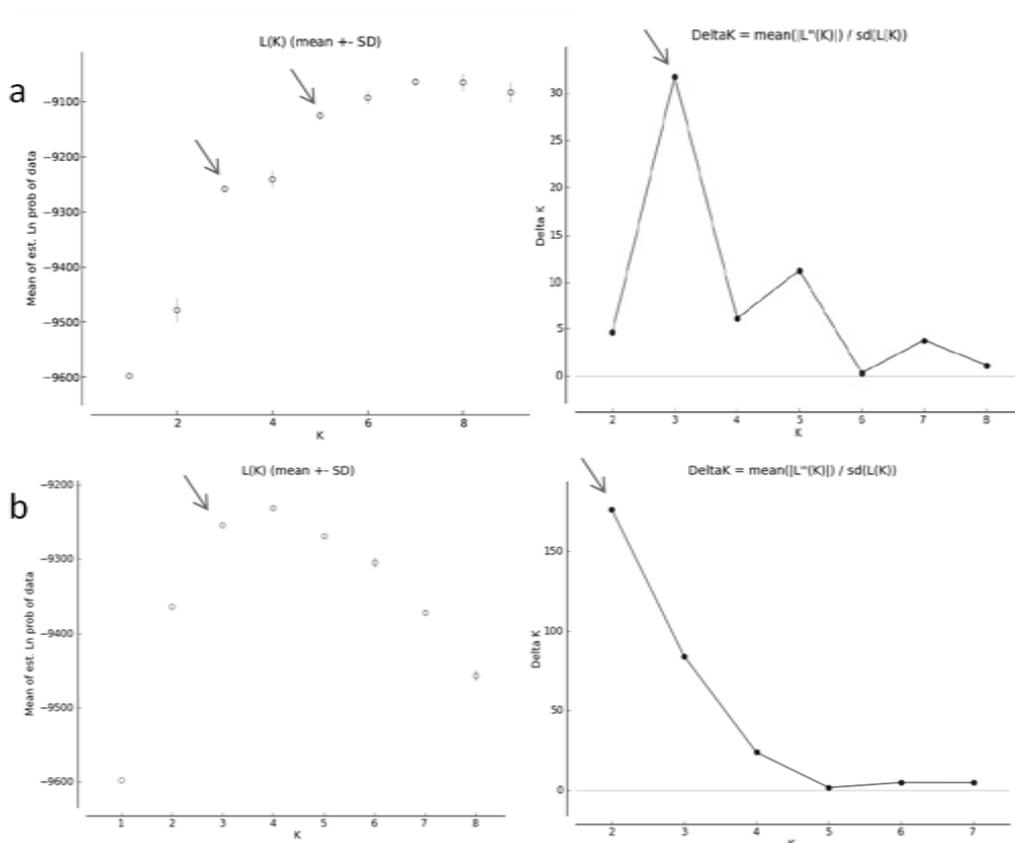


Figura 15) Gráfico dos valores médios de verossimilhança LnP(D) por número de partições mais provável (K), e de Delta K dos dados da espécie *P. saltatrix* do Brasil e EUA.

As setas destacam K indicado pelas análises. a) Corrida com frequências correlacionadas.
b) Corrida com frequências não correlacionadas.

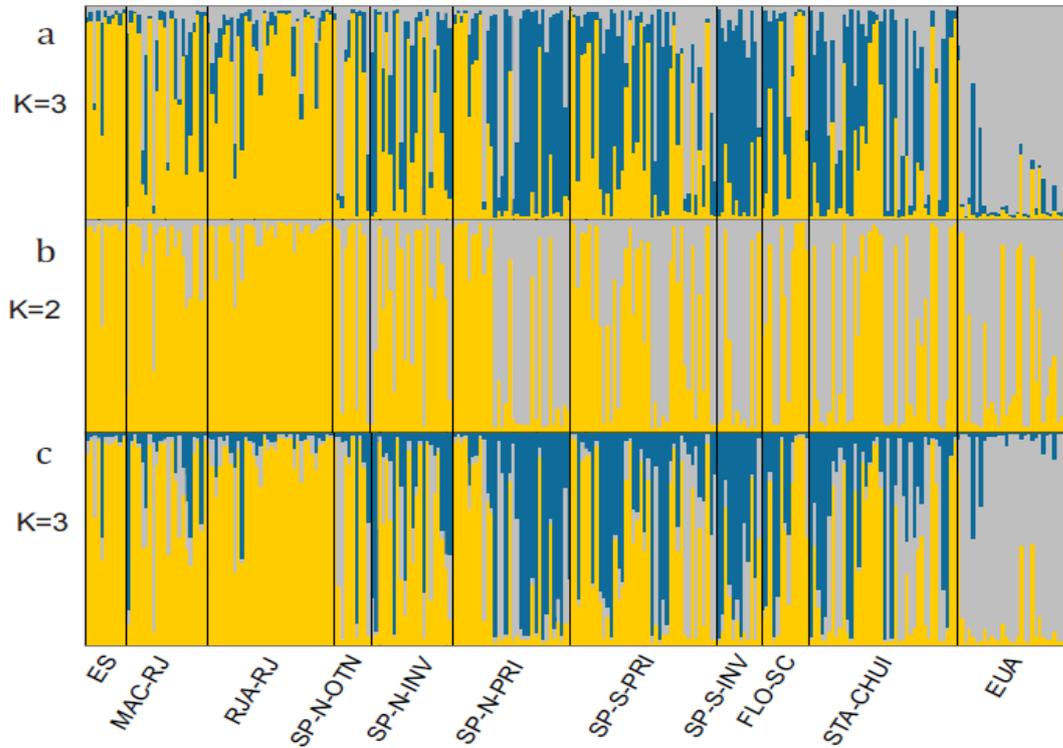


Figura 16) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população considerando o cenário de estruturação: a) três populações, resultado da análise realizada com frequências correlacionadas; b) duas populações e; c) três populações, resultados da análise realizada com frequências não correlacionadas.

Análises com amostras apenas do Brasil, sem *prior* de localidade

A análise com somente as amostragens do Brasil mostrou melhores valores $\ln P(D)$ e de ΔK coincidentes, mais elevados na hipótese de quatro populações na corrida de frequências correlacionadas. Já na corrida com frequências não correlacionadas, a melhor hipótese para ambos os métodos de inferência de K foi igual a duas populações. Os gráficos de barras de valor Q para essas análises não mostraram uma segregação clara das populações por localidade. No segundo gráfico (Figura 18 b) também se pôde observar uma predominância de um grupo ao norte da distribuição.

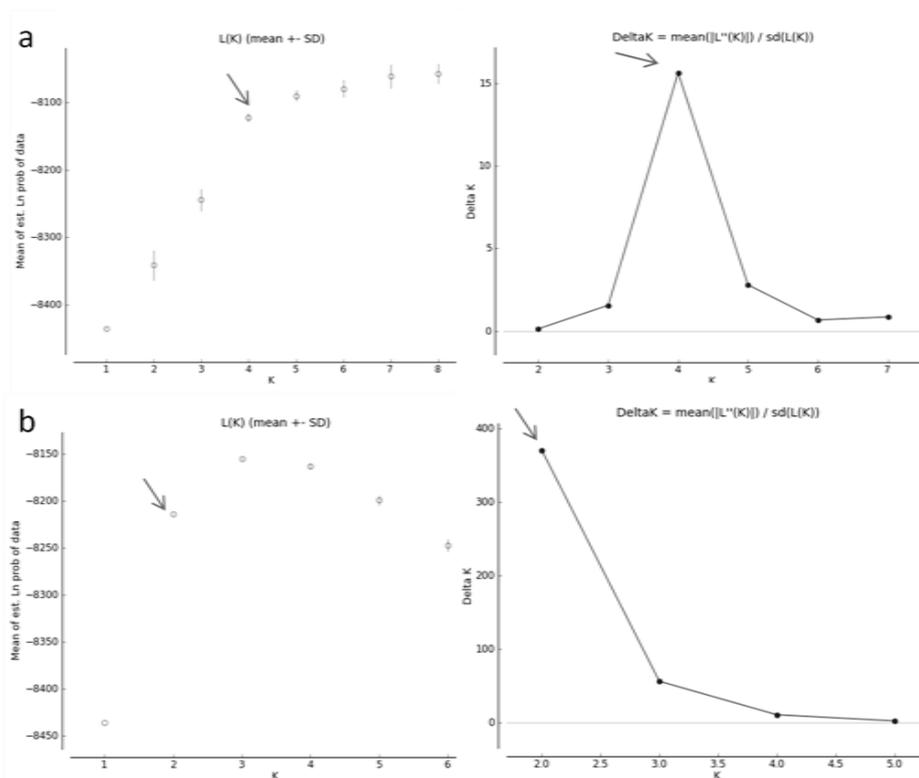


Figura 17) Gráfico dos valores médios de verossimilhança ($\ln P(D)$) por número de partições mais provável (K), e de Delta K dos dados analisados da espécie *P. saltatrix* do Brasil. As setas destacam K indicado pelas análises. a) Corrida com frequências correlacionadas. b) Corrida com frequências não correlacionadas.

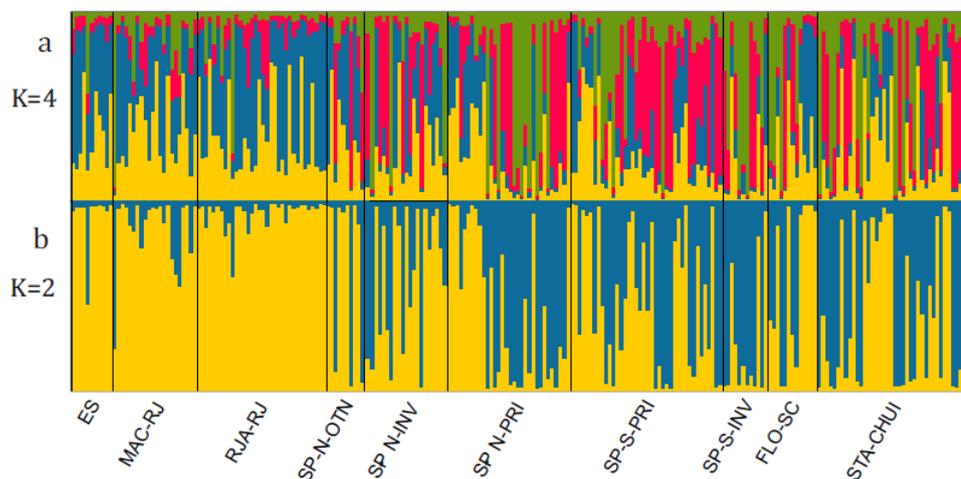


Figura 18)

Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população considerando o cenário de estruturação de: a) quatro populações da análise de frequências correlacionadas e b) duas populações da análise de frequências não correlacionadas.

Análises com amostras apenas do Brasil, com prior de localidade

Na análise com frequências correlacionadas, quatro populações foram identificadas pelo gráfico de Delta K, enquanto duas populações foram detectadas para as análises com frequências não correlacionadas, tanto pelo gráfico LnP(D) quanto pelo Delta K. Os gráficos de barras mostraram uma resolução geográfica um pouco melhor comparada àquelas obtidas nas análises sem o *prior*. Portanto foram demonstradas as corridas de K igual a quatro à corrida K igual a dois (Figura 20 a). Em todos os gráficos, a região que vai do ES ao RJA-RJ aparece relativamente bem definidas em relação às outras localidades que se mostraram mais heterogêneas. O valor médio de r , que determina se o *prior* utilizado foi informativo ($r < 1$) ou não ($r > 1$) (Hubisz *et al.* 2009), foi calculado para esses valores de K mais prováveis. Em ambas, o *prior* não se mostrou como informativo, apresentando valores médios acima de um.

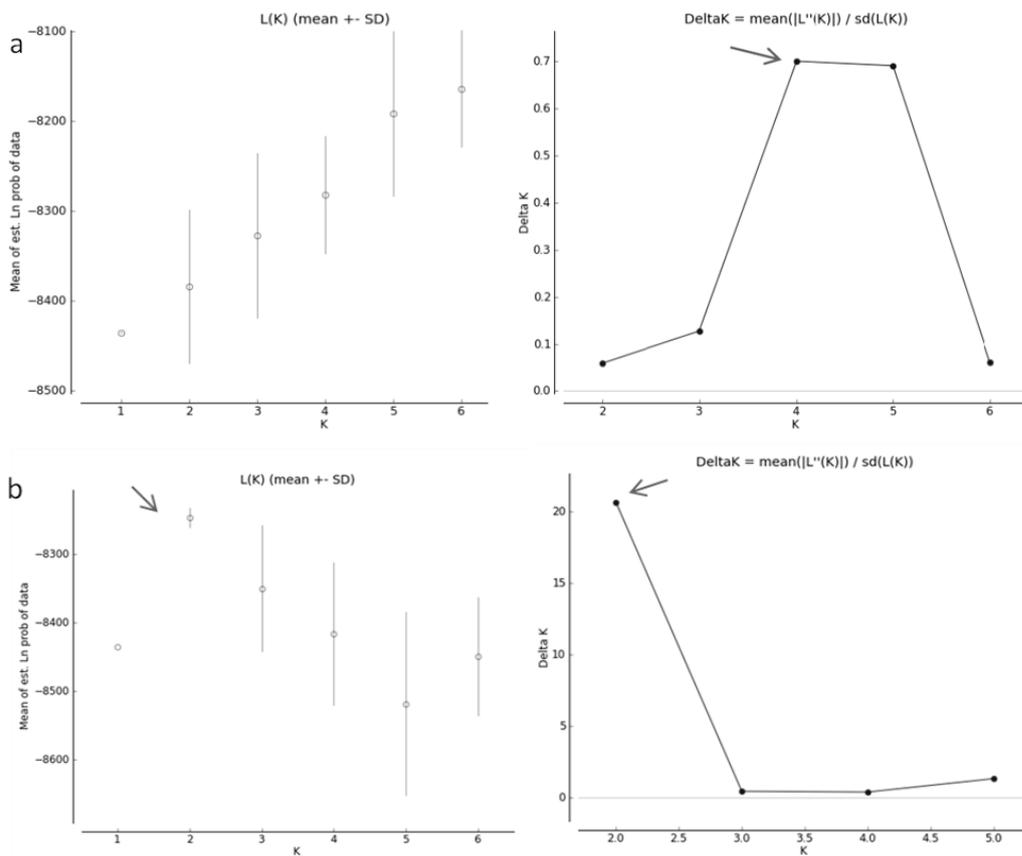


Figura 19) Gráfico dos valores médios de verossimilhança (LnP(D)) por número de partições mais provável (K), e de Delta K dos dados analisados somente da espécie *P. saltatrix* do Brasil. As setas destacam K indicado pela análise. a) Corrida com frequências correlacionadas. b) Corrida com frequências não correlacionadas.

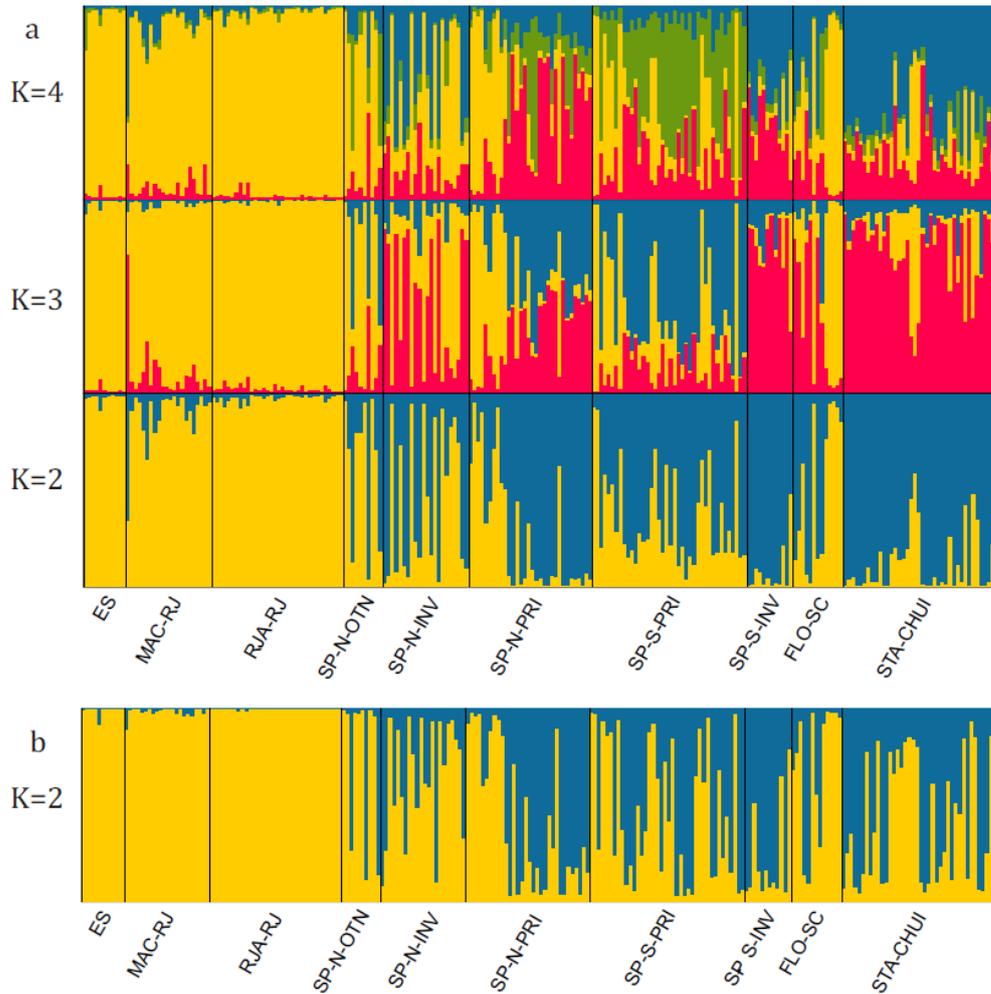


Figura 20) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população referente às corridas realizadas com *Prior* de localidade considerando o cenário de estruturação de: a) quatro, três, e duas populações (análise de frequências correlacionadas) e b) duas populações (análise de frequências não correlacionadas).

As análises de atribuição com os dados de microsatélites não conseguiram resolver claramente a estruturação populacional de *Pomatomus saltatrix* no Brasil a partir da região do litoral de São Paulo até o litoral sul do país. Dentro das localidades delimitadas, em todas as corridas, não foi observável uma homogeneidade geográfica de atribuição. A alta variância dos dados e valor médio de r maior que um demonstra que a estruturação não é bem explicada por regiões geográficas.

4.2.3 Comparações entre marcadores

mtDNA VS. mtDNA

Entre os marcadores citocromo oxidase I e citocromo b, levando em consideração os haplogrupos A e B (Figura 8 e Figura 9), não foi necessário fazer uma tabela de contingência, pois 100% das comparações foram coincidentes. Todos os indivíduos pertencentes ao haplogrupo A em COI permaneceram como A em cit b, assim como o inverso (B).

mtDNA VS. rodopsina

A comparação foi feita levando-se em conta as sequências de 191 indivíduos para os quais tanto os marcadores mitocondriais como o marcador da rodopsina foram amplificados. Observou-se uma coincidência de 91,6% entre os marcadores, considerando a congruência de linhagem entre os alelos. O valor de χ^2 da tabela de contingência (123,1) foi altamente significativo ($P < 0,0001$). Foram observados onze genótipos heterozigotos do gene da rodopsina compostos por alelos de linhagens distintas, e onze amostras se diferenciam em ambos os alelos da linhagem mitocondrial a que pertenceram.

mtDNA VS. Microssatélites

Para comparação entre esses marcadores, foi realizada uma análise dos dados de microssatélites usando como *prior*, os grupos de linhagens mitocondriais. O gráfico Q de barras (Figura 21) mostrou que existe uma correlação muito clara entre esses marcadores (índice médio r de 0,72). Alguns poucos indivíduos aparecem como discordantes dessa separação, dentre esses, todos pertencentes ao haplogrupo A mitocondrial, mas se mostram mais similares nos dados de microssatélites ao haplogrupo B. Essas informações foram utilizadas na tabela de contingência entre os marcadores.

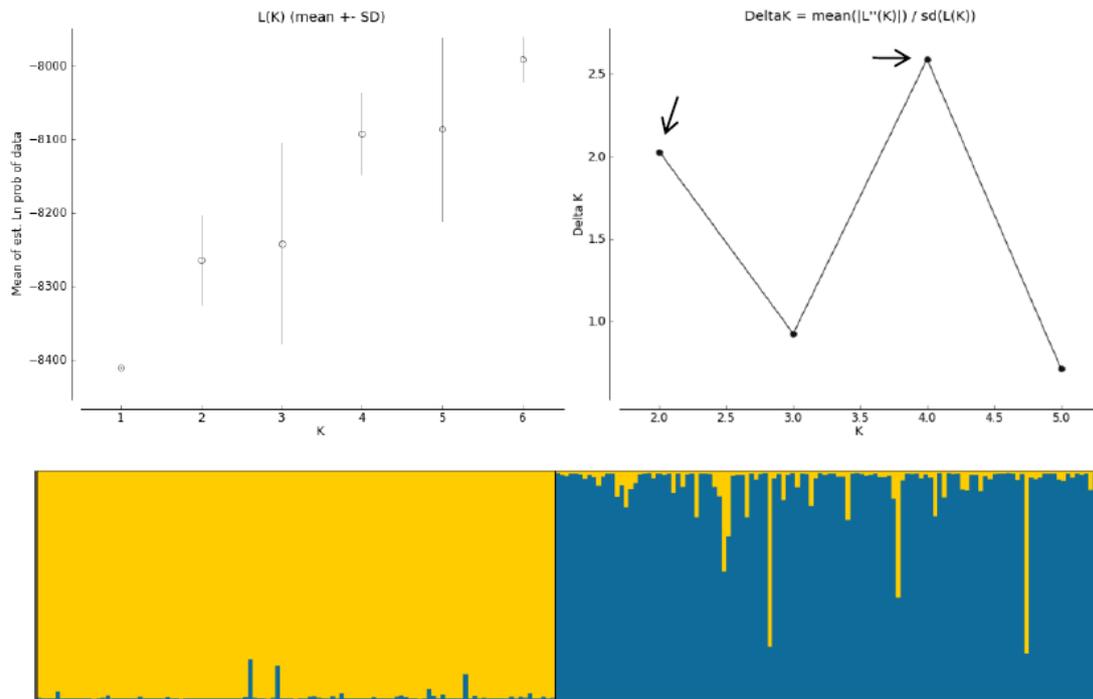


Figura 21) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população, considerando como cenário de estruturação de microssatélites coincidente com haplogrupos dos genes mitocondriais.

Considerando a origem de cada indivíduo baseado em uma proporção de mais de 50% de identidade (Q), o resultado de congruência entre os marcadores mtDNA VS Microssatélites se mostra também altamente significativo ($\chi^2=102$ $p<0,00001$).

Microssatélites VS rodopsina

O gráfico Q de barras, para os dados de microssatélites utilizando como *prior* a informação das sequências de rodopsina com frequências correlacionadas, também mostrou uma congruência maior entre esses dois do que por localidades geográficas. Alguns poucos indivíduos aparecem como discordantes dessa separação. O valor médio de r obtido foi de 4,02, ou seja, essa divisão em três grupos não explica os dados. A tabela de contingência levou a um valor de χ^2 de 207,2, que indica também um valor altamente significativo nessa comparação.

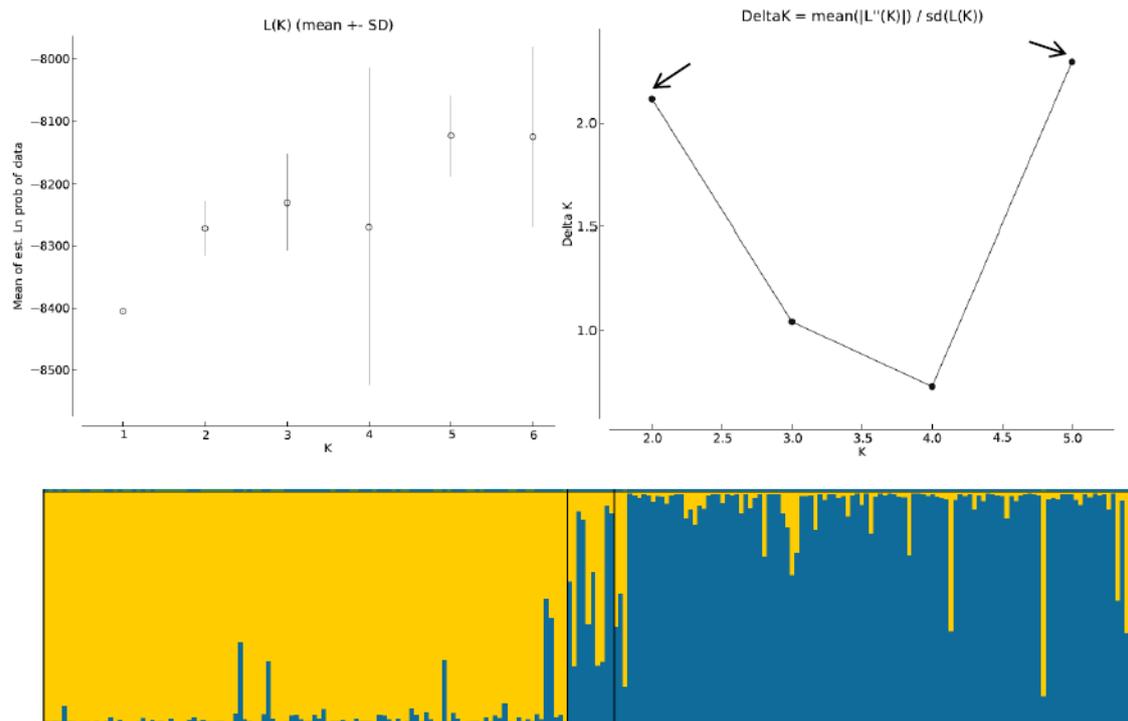


Figura 22) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população considerando como cenário de estruturação de microssatélites coincidente com haplogrupos A', B' e heterozigotos do gene rodopsina.

A estruturação de populações baseado nos dados de microssatélites foi mais bem estruturada quando utilizamos a informação dos haplogrupos mitocondriais. Para mais observações foram adicionados os índices obtidos pelo programa STRUCTURE nas corridas deste item em Anexos IV e V. As Tabelas de Contingência se encontram no Anexo VI.

5 Discussão

Esta dissertação usou diferentes marcadores moleculares e abordagens analíticas e encontrou padrões de estruturação populacional nunca antes observados para anchovas no mundo inteiro. A alta estruturação é inesperada para peixes pelágicos com potencial de dispersão relativamente alto. Para tentar compreender esse padrão inferido e aprofundar os resultados desse trabalho, algumas novas abordagens e comparações foram sendo conduzidas ao longo da discussão.

5.1 Diversidade Genética e Análises de Estruturação populacional

As localidades no Brasil mostraram altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica que foram, na maioria das vezes, maiores do que aqueles observados em outros continentes. Os índices de diversidade haplotípica dos marcadores mitocondriais observados para Brasil (0,94 e 0,79) e EUA (0,81 e 0,78) foram similares, e se assemelham àqueles já reportados em outros trabalhos (Goodbred e Graves, 1996, Miralles *et al.* 2015). Já as diversidades nucleotídicas, em ambos marcadores, foram mais altas para o Brasil (0,010) do que para Estados Unidos, neste (0,003) e em outro trabalho (cit b=0,005, Pardiñas *et al.* 2010), assim como também para o Mar Mediterrâneo (cit b=0,001, Pardiñas *et al.* 2010). Para o gene da rodopsina, os valores de diversidade tanto haplotípica quanto nucleotídica do Brasil ($h=0,51$; $\pi=0,005$) superam os observados nos EUA e no Mediterrâneo juntos, locais onde só foi observado um mesmo haplótipo. O mesmo padrão ocorre com os dados de microssatélites que apresentaram variabilidade semelhante entre o Brasil ($H_e=0,94$) e EUA ($H_e=0,92$), valores maiores dos que observados no Mediterrâneo ($H=0,7-0,8$) em Miralles *et al.* (2014).

A alta diversidade nucleotídica observada nos marcadores de DNA mitocondrial na costa Sudoeste Atlântica pode ser atribuída à presença de duas linhagens de haplótipos com distância p relativamente alta entre si (0,01) se comparada a outras regiões como EUA, Sul da África, Mediterrâneo e Austrália, que possuem distâncias menores entre os grupos de haplótipos locais. O mesmo padrão de duas linhagens foi observado também para o gene da rodopsina. A divergência entre os haplótipos das linhagens observadas para esse gene nuclear no Brasil também foi de 0,01 (distância p). Esse resultado é incomum, dado que a evolução em marcadores nucleares tende a ser menor do que em marcadores mitocondriais, em decorrência de taxas mais lentas de mutação e ao tamanho populacional efetivo (N_e), superior para genes nucleares, que diminui a probabilidade de fixação de novos alelos (Sunnucks 2000).

A análise de atribuição Bayesiana apoiou diferentes partições das populações em que as anchovas do Brasil estão estruturadas. Os conflitos ocorreram principalmente entre as análises feitas considerando as frequências correlacionadas e não correlacionadas. Quando há presença de alelos nulos e erros de genotipagem, o número de populações pode ser superestimado ao utilizarmos o modelo de frequências correlacionadas (Flaush *et al.* 2003). Também podem ocorrer problemas na estimativa de K em populações estruturadas por distância, ou quando grupos de indivíduos mais aparentados entre si são

incluídos na amostragem (Pritchard *et al.* 2007). É importante utilizar o menor K que melhor estrutura os dados e que tenha um sentido biológico mais provável. Assim, escolhemos como o melhor cenário aquele que divide as amostras em duas populações. O suporte para essa estruturação é a baixa variância do valor da média de K, ou seja, as cadeias de MCMC coincidiram nas corridas. Apesar do uso de frequências não correlacionadas para inferir o valor de K ser mais conservador, o modelo de frequências correlacionadas pode ter uma acurácia maior na determinação dos clusters de indivíduos (Flaush *et al.* 2003). Esse modelo mais bem define as populações com ancestralidades próximas e que naturalmente possuem frequências similares. Apesar do cenário de estruturação em duas populações no Brasil ter sido considerado como mais provável, os resultados das corridas com K maior do que estes não foram desconsideradas, para permitir uma exploração visual de cenários alternativos de estruturação.

Mesmo utilizando a divisão das amostras do Brasil em duas populações, os gráficos de probabilidade de atribuição (Q) não resolvem de maneira muito clara a estruturação populacional de anchovas do Brasil. Isso pode ter acontecido devido ao número limitado de *loci* analisados, associados a uma distância gênica não muito grande entre as populações para esses marcadores, como observado nos valores de F_{ST} par a par (maior dentro do Brasil = 0,03), que pode atrapalhar as análises (Hubisz *et al.* 2009). Esse padrão pode ser encontrado em cenário de populações muito grandes com separação recente onde a deriva gênica é pequena pra diferenciar as frequências alélicas, havendo uma retenção do polimorfismo da população ancestral (Lugon-Moulin 2002). A presença de alelos nulos que desviam as populações do Equilíbrio HW (Flaush *et al.* 2003) também podem refletir em gráficos não bem delimitados. Nesses casos, segundo Pritchard *et al.* (2000), o *prior* adicionado a análise pode aumentar a resolução do resultado. No entanto, é importante verificar o valor do índice médio de r para certificar se essa informação adicionada explica a variância dos dados ($r < 1$) ou não ($r > 1$) (Hubisz *et al.* 2009). No caso da análise com *prior* de localidade com as amostragens do Brasil, o valor de r foi alto (> 1), demonstrando que a distribuição geográfica não é concordante com a estruturação populacional. Já quando o *prior* utilizado foi o de haplogrupos mitocondriais, a média dos valores de r foi menor do que 1. Esse resultado significa que esse *prior* é concordante com a estruturação, e as populações coincidem com as linhagens mitocondriais, que estão sobrepostas em parte da distribuição. Esse cenário fornece uma explicação plausível para a dificuldade em verificar clusters geograficamente distribuídos nos gráficos de probabilidade de atribuição (Q). Esses grupos bem delimitados no gráfico só ocorrem quando verificamos as localidades de Espírito Santo, Macaé-RJ e Rio de Janeiro - RJ, onde há o predomínio de apenas um grupo mitocondrial.

A comparação entre os marcadores moleculares de diferentes naturezas, taxas evolutivas e padrões de hereditariedade foram concordantes na separação das amostras como observado nas tabelas de contingência. Essa similaridade da divergência dos marcadores em dois grupos deve ser devido a sua história evolutiva. Assim, as populações do Brasil mostram uma separação profunda em duas linhagens evolutivas que ocorrem ao longo da costa, com a predominância de uma linhagem mais ao norte e outra mais ao sul. Essa separação é especialmente clara quando são considerados em conjunto os dados dos marcadores de sequências (mitocondriais e nuclear), e de frequências, corroborando de forma independente, as duas linhagens observadas.

Quando as amostras são analisadas levando-se em conta as localidades de coleta, os índices de estruturação populacional (ϕ_{ST} e AMOVA) para as sequências são significativos entre diversas localidades do Brasil, e entre diferentes estações do ano. Normalmente esse resultado seria interpretado como estruturação populacional geográfica. A maior estruturação entre os locais mais distantes poderia ainda indicar um efeito de isolamento por distância. A análise das amostras definidas *a priori* é o padrão para estudos de estruturação populacional. Entretanto, uma análise mais detalhada e conjunta dos dados nucleares e mitocondriais indicou que essa explicação seria equivocada. No caso das anchovas do Brasil, observamos um isolamento parcial entre elas em grande parte da sua distribuição geográfica, com uma separação mais clara nos extremos das populações analisadas. Os índices que podem ser considerado mais relevantes neste cenário, em ϕ_{ST} , são aqueles que envolvem comparações entre locais onde só foi observado uma das linhagens, como Espírito Santo comparado ao litoral Sul de São Paulo no período de Inverno. Nesses casos observamos valores de ϕ_{ST} de 0,73 para sequências do cit b, 0,84 para COI e 1,00 para a Rodopsina, dentro da faixa de valores muito altos de diferenciação (Holsinger e Weir 2009). Esses valores são similares aos obtidos entre as populações de diferentes continentes, observados neste e em outros trabalhos para a mesma espécie (Pardiñas *et al.* 2008, Miralles *et al.* 2014).

As mesmas análises de estruturação populacional F_{ST} e AMOVA para microssatélites resultaram em valores bem baixos de estruturação entre as localidades do Brasil. Valores similares são observados também comparando ambos os lados do Atlântico Norte (Miralles *et al.* 2014). Tal resultado é comum para microssatélites em populações que possuem um número populacional efetivo muito grande, levando muito tempo para diferenciar frequências gênicas entre populações, mesmo com fluxo gênico restrito (Niegel 2002). Da mesma forma como observado com as análises de sequências, os maiores valores de diferenciação ($F_{ST}=0,03$) foram observados entre as amostras do Espírito Santo

e do sul do Estado de São Paulo no Inverno, coincidentes com as localidades onde somente uma das linhagens mitocondriais foi encontrada. A diferenciação observada entre essas localidades foi a mesma que obtida entre Brasil e Estados Unidos. Ou seja, baseado nesse índice de microssatélites, as populações brasileiras são tão divergentes entre si do que as populações do Brasil e da costa Atlântica Noroeste, ou tão divergentes quanto as populações dos dois lados do Atlântico Norte (F_{ST} : 0,02 a 0,03, Miralles *et al.* 2014).

A mistura de populações diferentes resulta, devido efeito Wahlund, em deficiências de heterozigotos. De fato, pudemos observar que, os valores de índice de endocruzamento (F_{IS}), se apresentam significativos em quase toda a distribuição amostrada, com exceção das localidades mais ao norte da distribuição (ES e MAC-RJ) onde apenas um grupo foi encontrado (Figura 23).

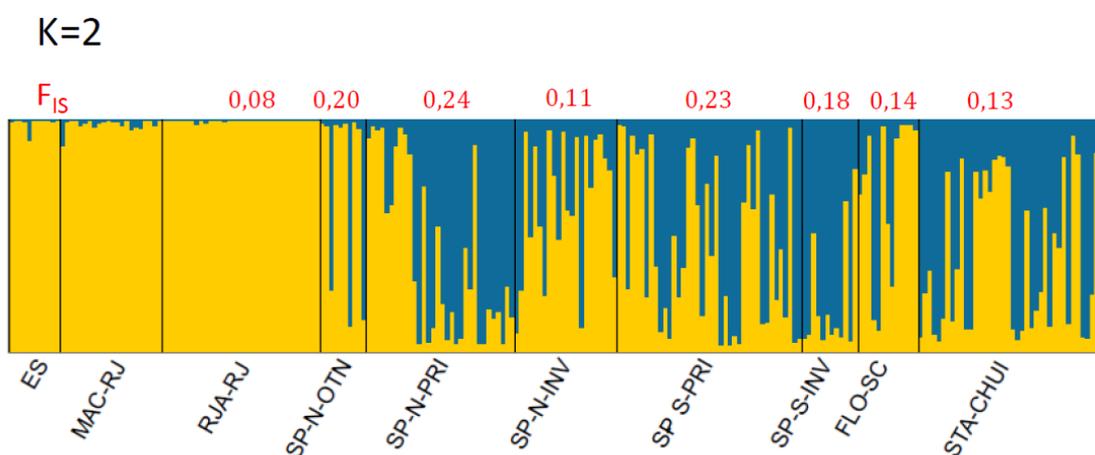


Figura 23) Gráfico de barras de coeficiente Q para cada indivíduo de *P. saltatrix* por população considerando o cenário de estruturação de 2 populações. Números em vermelho representam valores significativos do índice F_{IS} *Multilocus* sem ELF 19 e ELF46.

Na maioria das localidades onde o índice F_{IS} foi significativo, observamos proporções variadas das duas linhagens por grupo de amostras coletadas em um mesmo lugar ou época distinta, o que poderia estar causando, por efeito Wahlund, as deficiências. Buscando maior consistência para essa hipótese, calculamos o índice de endocruzamento F_{IS} separando as amostras por linhagem mitocondrial, e por localidade de coleta. Os *loci* com porcentagens totais de alelos nulos maiores do que 0,15 não foram utilizados.

Tabela 18) Valores de endocruzamento (F_{IS}) baseados em dados de microssatélites, calculados para espécie *Pomatomus saltatrix* de indivíduos pertencentes à linhagem mitocondrial A. Os valores significativos após correção FDR estão assinalados com *. Células destacadas apresentam valores acima de 0,25.

Linhagem A	MAC/SP-N-OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA CHUI	Total
ELF17	0,00	0,03	0,05	0	0,01	0	0,06	0,03
ELF37	0,07	0,12	0,40*	0,14	0,13	0,47	0,06	0,18*
ELF39	0,14	0,73*	0,58*	0,63*	0,38*	0,37*	0,39*	0,50*
ELF49	0,08	0,12	0,28*	0,03	0,20	0,08	0,00	0,11*
<i>Multilocus</i>	0,07	0,26*	0,32*	0,20*	0,18*	0,21*	0,13*	0,28*

Tabela 19) Valores de endocruzamento (F_{IS}) baseados em dados de microssatélites, calculados para espécie *Pomatomus saltatrix* de indivíduos pertencentes a linhagem mitocondrial B. Os valores significativos após correção FDR estão assinalados com *. Células destacadas apresentam valores acima de 0,25.

Linhagem B	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OTN	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	FLO SC	STA CHUI	Total
ELF17	0,03	0,11	0,11	0,36*	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08*
ELF37	0,15	0,00	0,22*	0,35*	0,16	0,31	0,20	0,30	0,27	0,19*
ELF39	0,08	0,00	0,03	0,00	0,19	0,00	0,02	0,00	0,02	0,04
ELF49	0,05	0,05	0,00	0,04	0,27	0,01	0,00	0,00	0,12	0,03*
<i>Multilocus</i>	0,08	0,02	0,08*	0,19*	0,17*	0,07	0,04	0,00	0,10	0,11

Tabela 20) Valores de endocruzamento (F_{IS}) por localidade e época de coleta sem distinção de linhagem. Os valores significativos após correção FDR estão assinalados com *.

	ES	MAC RJ	RJA RJ	SP-N OUT	SP-N PRI	SP-N INV	SP-S PRI	SP-S INV	FLO SC	STA/CHUI	BRASIL
ELF17	0,03	0,09	0,11	0,32*	0,05	-0,04	0,03	0,01	0,00	0,05	0,06*
ELF37	0,15	0,00	0,22*	0,43*	0,14*	0,15	0,31*	0,13	0,42*	0,10	0,18*
ELF39	0,08	0,02	0,03	0,00	0,60*	0,29*	0,35*	0,38*	0,21*	0,36*	0,29*
ELF49	0,05	0,05	0,00	0,04	0,16*	0,04	0,22*	0,20	0,00	0,00	0,08*
<i>Multilocus</i>	0,08	0,03	0,08*	0,20*	0,24*	0,11*	0,23*	0,18*	0,14*	0,13*	0,16*

Para a linhagem B, os valores de endocruzamento F_{IS} diminuíram ou deixaram de ser significativos em várias localidades e *loci* quando essa foi analisada separadamente. Na linhagem A, alguns valores de F_{IS} também diminuíram e deixaram de ser significativos, no

entanto, o contrário ocorreu no *locus* ELF39 e na localidade SP-N-INV. Os valores desse marcador se mostraram relativamente altos em quase todas as localidades, demonstrando que existe ainda um déficit de heterozigoto considerável em relação ao esperado, influenciando também os valores absolutos *multilocus*, que também aumentaram em relação à análise antes da segregação. Esse *locus* apresentou valores relativamente expressivos de alelos nulos (Tabela 14) por localidade. A baixa eficiência de amplificação de alguns alelos pelo método de PCR pode ser a explicação. Os iniciadores foram desenhados para organismos provenientes da África do Sul (Dos Santos 2009), que estão evoluindo independentemente com relação às populações do Brasil. Alterações aleatórias nas sequências flanqueadoras desses marcadores poderiam levar a amplificação diferencial de alguns alelos, conseqüentemente, indivíduos heterozigotos seriam analisados como homozigotos (Guichoux *et al.* 2011). A hipótese de estar ocorrendo endocruzamento é mais remota, esse processo tende a diminuir a variabilidade genética da população (Hartl 1988), o que não é observado. As localidades na região mais ao sul da distribuição foram as que apresentaram os mais altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica.

Observamos também as frequências dos alelos por *locus* dos microssatélites utilizando a segregação por linhagens. Utilizando essas informações, foi observado que, além da divergência das frequências de alelos entre essas linhagens, existem também alelos exclusivos de cada grupo (Figura 24).

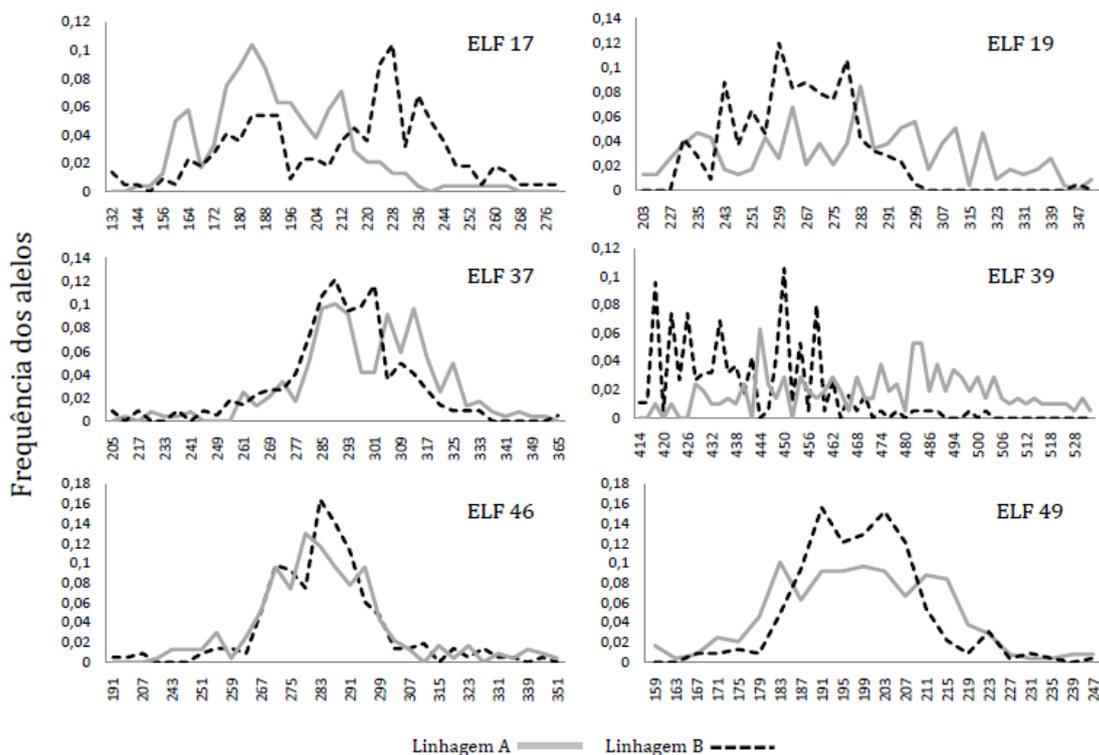


Figura 24) Gráficos contendo as frequências dos alelos de cada *locus* de microssatélite da espécie *Pomatomus saltatrix* entre os grupos segregados por linhagens mitocondriais.

Com essas novas abordagens, podemos observar que os marcadores nucleares hipervariáveis, apesar de apresentarem mais limitações para as análises, também mostraram outros indícios de estruturação populacional, como alelos exclusivos e frequências divergentes, que caracterizam populações com restrição de fluxo gênico (Balloux e Lugon-Moulin, 2002).

5.2 Variações sazonais das populações

Para algumas espécies de importância pesqueira, existem registros de uma segregação entre estoques com limites coincidentes no cabo de Santa Marta - SC (Vaz-dos-Santos *et al.* 2009, Haimovici *et al.* 2006, Vasconcellos *et al.* 2015). No entanto, as espécies com esse padrão são em geral demersais e bênticas e sem registro de longas migrações. Para as anchovas, houve uma predominância de uma linhagem na região mais ao norte da sua distribuição, a partir da região de coleta do Rio de Janeiro - RJ, e a gradativamente a predominância da outra linhagem na direção sul. Sendo assim, os fatores que determinam a segregação populacional de *P. saltatrix* parecem ser diferentes daqueles que determinam

diferenciação de estoques pesqueiros de espécies de menor vagilidade no Cabo de Santa Marta-SC.

A descontinuidade populacional das Anchovas no Brasil parece coincidir dentro da Baía Sul do Brasil (SSB). Essa região é conhecida como uma província geográfica marinha que se estende de Cabo de São Tomé - RJ (23°S) até cabo de Santa Marta - SC (28°S). A região sofre ciclos térmicos sazonais fortes ocorrendo no inverno uma homogeneização das águas com a quebra da camada termo-halina, modificando a temperatura e disponibilidade de recursos na coluna d'água (Berzone *et al.* 1999). A circulação local de massas d'água possui um padrão complexo, com variação de correntes que modificam as temperaturas superficiais na costa e em maiores profundidades. No inverno, a massa de Águas Sub-Antárticas ocupa da superfície até 50 metros de profundidade, de maiores latitudes até a região mediana da Baía Sul do Brasil, atingindo até a região de Ubatuba - SP (Sunyé e Servain 1998), enquanto que nas mesmas profundidades no verão toda a região é ocupada por três diferentes massas: Águas costeiras na superfície; Águas de plataforma entre 19 e 29m; e Águas centrais do Atlântico sul (ACAS) até as maiores profundidades (Sunyé e Servain 1998, Berzone *et al.* 1999).

A porção mais ao norte dessa região biogeográfica, que vai desde a Bacia de Ilha Grande - RJ até Arraial do Cabo - RJ, se diferencia das demais por alguns aspectos. No inverno, a massa d'água predominante na região é de Águas costeiras, enquanto que nas regiões mais ao sul a massa d'água predominante é mais fria (Sunyé e Servain 1998 - Anexo VII). Na região de Cabo Frio - RJ, a plataforma continental possui uma menor extensão, e a influência dos ventos aumenta no verão. Por esse conjunto de condições, descontinuamente, a massa d'água ACAS aflora na superfície, modificando drasticamente temperatura e salinidade (Castelao e Barth 2006) e elevando níveis de produção primária com altos níveis de nutrientes trazidas por elas (Valentin 2001). Esse fenômeno se estende para regiões próximas como Rio de Janeiro - RJ, mas influencia até o norte do Estado de São Paulo.

As temperaturas da superfície costeira do Brasil, durante o ano de coleta da maioria das amostras do litoral de São Paulo (2014), foram obtidas pela base de dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Observa-se uma variação considerável da superfície da água ao longo da Baía Sul do Brasil e ao longo das demais regiões de distribuição das anchovas (Figura 25).

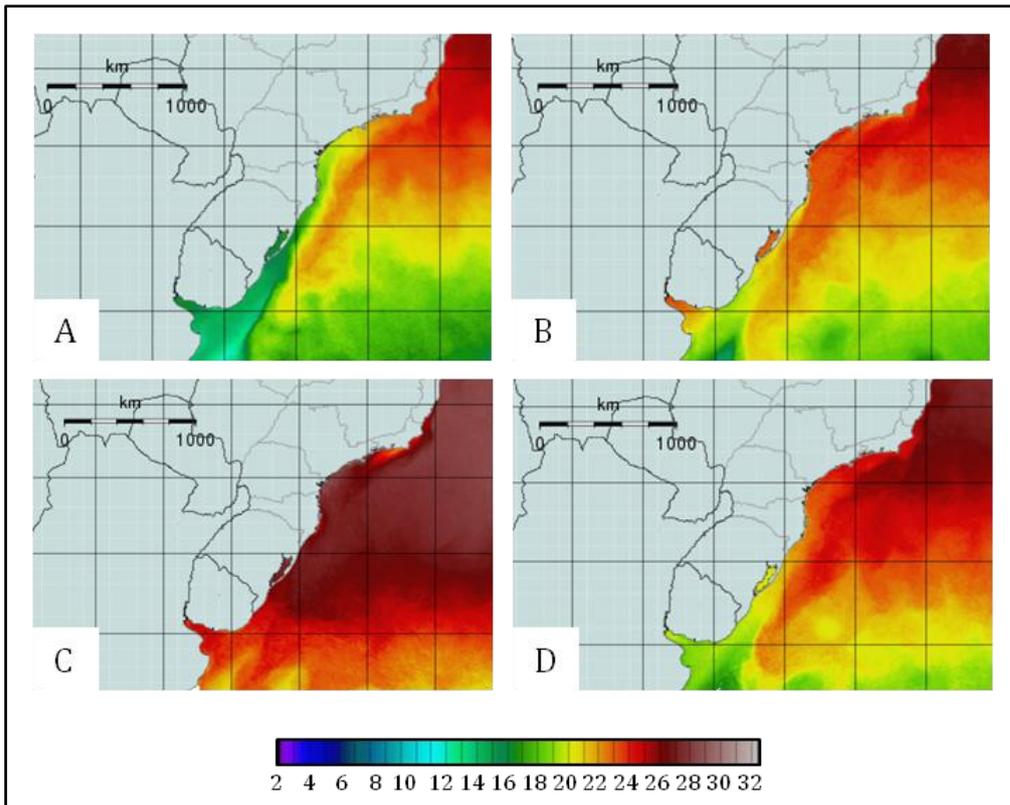


Figura 25) Dados de satélite da temperatura média mensal na superfície nos meses: A) de Agosto (2013); B) Novembro (2013); C) Fevereiro (2014) e; D) Maio (2014). As imagens foram obtidas na base de dados online do INPE e editadas. As cores representam as temperaturas em °C correspondentes a legenda.

As anchovas demonstraram nas análises uma segregação geográfica, mas são animais que possuem ciclos de migração bem delimitados. As informações de coletas sazonais que se mostraram distintas, incorporadas nas análises locais, acabam por deixar o cenário ainda mais complexo. Para isso a Figura 26 foi produzida para tentar elucidar esses resultados. As linhagens mitocondriais foram diferenciadas em cores e, suas frequências por localidade e por época de coleta, adicionadas ao mapa. Além das amostragens intencionalmente realizadas para testar a sazonalidade, em outras localidades onde foram obtidas em mais de uma estação de coleta, também foram distinguidas.

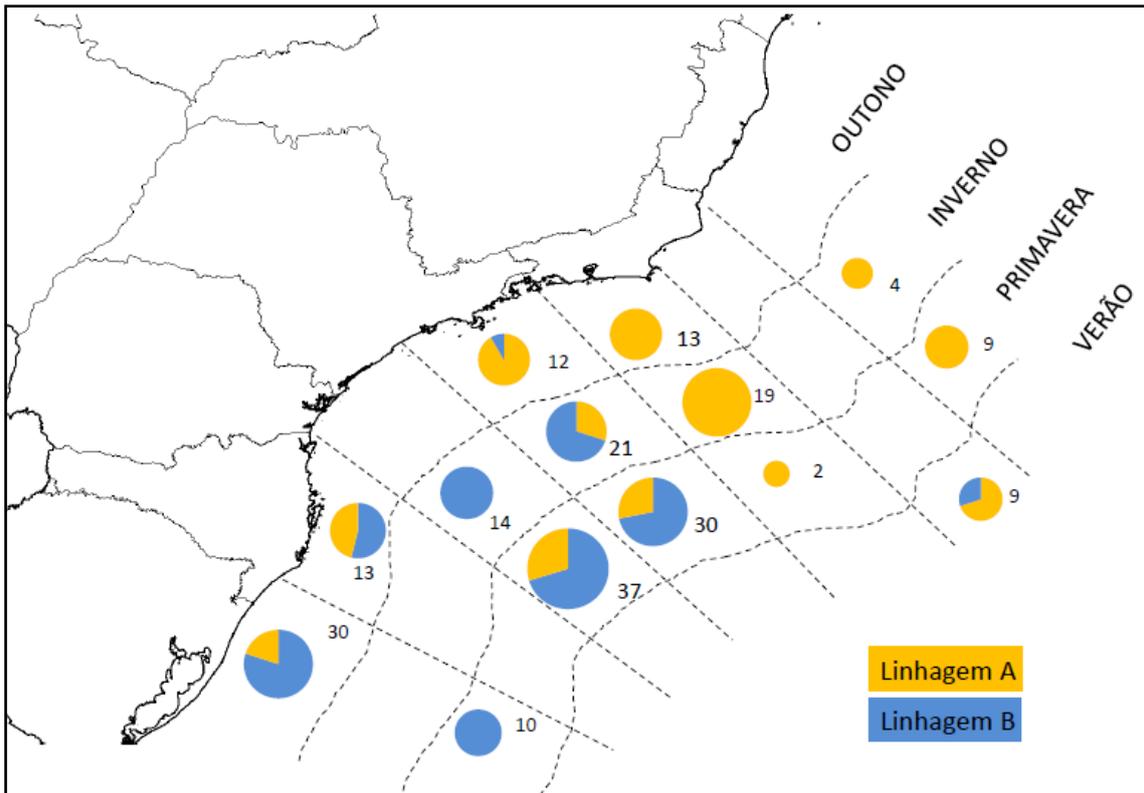


Figura 26) Distribuição das linhagens do DNA mitocondrial de *P. saltatrix* por localidade da costa brasileira e por época de coleta. Os números indicam a quantidade de indivíduos analisados para cada localidade/época.

A Figura 26 demonstra uma movimentação das linhagens para o norte com o esfriamento das águas no inverno e permanência nas regiões mais ao sul após o aquecimento das águas (Outono). Esse padrão geral de movimentação entre temperaturas frias e quentes é reportado para anchovas em todo o mundo (Juanes *et al.* 2006). Uma região limite com pequeno contato entre as populações, como hipótese inicial, só foi observada mais claramente no inverno na região norte de São Paulo, onde para menores latitudes só houve a presença de uma população e para maiores latitudes somente a outra. Mas nas outras estações do ano a sobreposição entre as duas linhagens atingiu uma amplitude geográfica maior, se estendendo até quase toda a distribuição estudada.

A região do litoral de São Paulo foi onde as frequências por população mais variaram, principalmente no litoral norte. As temperaturas costeiras da região de Ubatuba-SP (Figura 27) quando comparadas às frequências por estação nessa localidade sugerem uma correlação da temperatura do mar com a composição de linhagens das anchovas capturadas. A amostragem do Outono, que apresentou a maior proporção da linhagem B (amarelo) foi coletada em um período onde a temperatura da água estava mais elevada do que as demais. Nas outras duas coletas (Inverno e Primavera), quando a

temperatura estava mais baixa, a composição de indivíduos nessa localidade foi em maioria da linhagem A (azul).

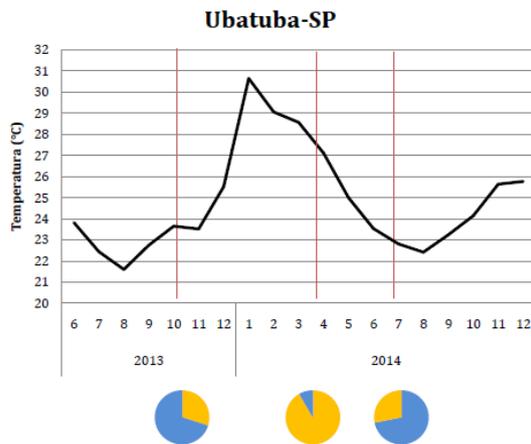


Figura 27) Valores médios da temperatura superficial da água por mês coletado em Ubatuba – SP de Julho de 2013 a Dezembro de 2014. Dados fornecidos por LAB-DADOS (IO-USP). As coletas de *P. saltatrix* realizados neste trabalho nos determinados períodos estão assinaladas com linhas coloridas. O símbolo * se refere à coleta realizada no mesmo mês apontado, mas em ano distinto (2009).

Temperaturas obtidas por boias fixas (do projeto PNBOIA-GOOS Brasil) em regiões oceânicas também sugerem a mesma correlação para as outras localidades de coleta. As temperaturas parecem influenciar a proporção das duas linhagens das anchovas em cada localidade (Figura 23).

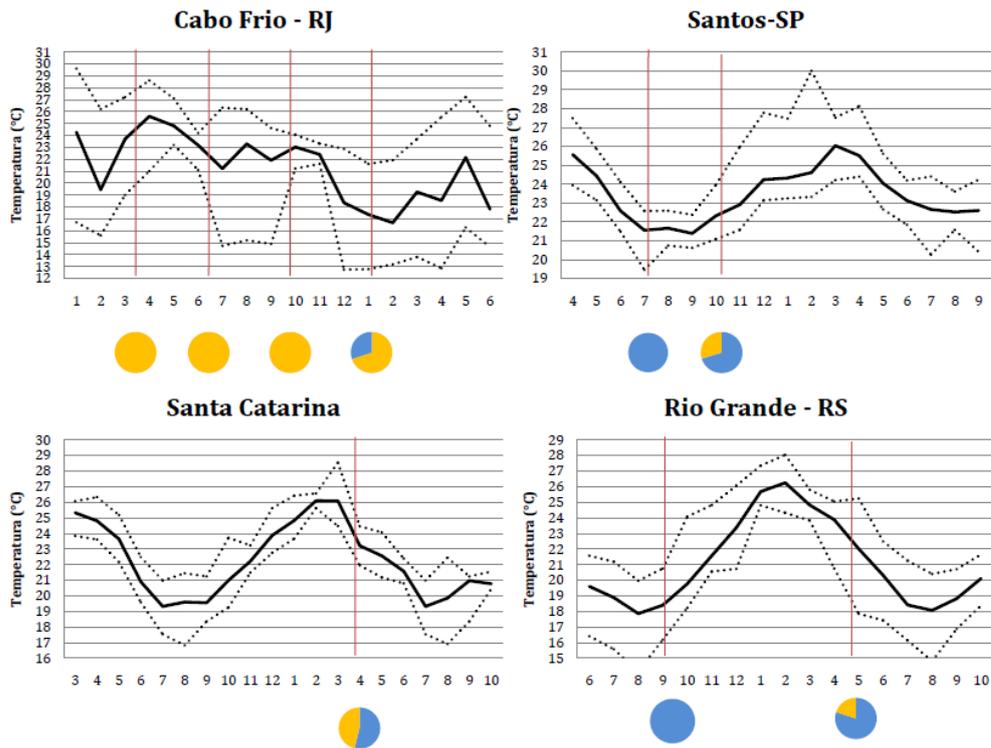


Figura 28) Gráficos de Temperatura do mar média mensal (linha contínua), máximas e mínimas (linhas pontilhadas) de superfície em quatro pontos de regiões oceânicas coletados por boias fixas do projeto PNBOIA-GOOS Brasil. A linhas verticais apontam o mês em que amostras foram coletadas próximas a essas localidades. Os círculos são o mesmo correspondentes a figura 21. As cores representam as frequências das linhagens A (azul) e B (amarelas) de anchovas do Brasil. No gráfico Cabo Frio-RJ estão representadas as amostras coletadas em RJA-RJ e MAC-RJ (mais à direita), e no gráfico de localidade Santos-SP estão representadas as amostragens de SP-S.

Era esperado que, nas coletas de primavera, já houvesse uma movimentação das anchovas para latitudes maiores (Haimovici e Krug 1989; Haimovici e Krug 1996), mas esse padrão não foi observado. É possível que essa migração pode mais tardiamente quando as águas estão mais aquecidas. Haimovici e Krug (1996) já haviam sugerido que as anchovas do litoral Sudeste poderiam pertencer a um estoque distinto, e estar relacionadas às ressurgências de Cabo Frio – RJ. Aquela região frequentemente é vista como barreira a espécies tropicais, mas para a anchova, uma espécie que habita diferentes ambientes no mundo, é provável que esteja servindo como área favorável devido à abundância de recursos e temperaturas mais amenas no verão em decorrência das ressurgências. Esse fenômeno natural na região atrai toda uma comunidade pelágica como lulas (*Doryteuthis plei*) e anchovetas (*Engraulis anchoita*), espécies comuns da dieta da espécie (Lucena *et al.* 2000). Esse aumento de produtividade acaba por atrair também

animais predadores (Valentin 2001). As ressurgências ocorrem de forma descontínua no final da primavera e durante o verão, mesma época de maior abundância registrada para as anchovas no litoral da Região Sudeste e provável época de desova (Silvano e Begossi, 2009). No entanto, as condições oceanográficas onde larvas de anchovas foram observadas na região sul, em temperaturas entre 19°C e 21°C com salinidades entre 2,9% e 3,6% (Muelpert e Sinque 1996), são mais similares a massa d'água de plataforma do que da ACAS (Sunyé e Servain 1998).

Heger *et al.* (2010) relataram diferentes padrões de movimentação das anchovas na costa da África do Sul. Na costa Oeste, onde também ocorrem ressurgências durante o verão, as anchovas apresentaram um padrão preferencialmente residente nas lagoas de Saldanha, enquanto que na costa Leste apresentam o padrão geral de migração sazonal (Van der Elst 1976, Beckley e Connell 1996). Nos Estados Unidos também foi observado por Sheperd *et al.* (2006) diferentes padrões de migração. Apesar das variações observadas, na costa norte americana, não foi reportado o mesmo padrão de estruturação populacional do que o observado no Brasil. A população se mostra como panmítica nessa localidade (Pardiñas *et al.* 2010, Miralles *et al.* 2014, Graves *et al.* 1992)

5.3 Filogeografia

Os marcadores mitocondriais são moléculas ideais para inferências filogenéticas e demográficas (Avice 1987) e podem dizer muito sobre a história evolutiva das populações. Valores de diversidade haplotípica e nucleotídica altos são encontrados em populações grandes e estáveis, ou em contatos secundários de populações alopátricas divergentes (Grant e Bowen 1998). A presença de duas linhagens mitocondriais, como observado para anchovas do Brasil, pode ser atribuída tanto a histórias evolutivas distintas, devido ao acúmulo de diferenças fixadas ser esperado com o decorrer do tempo em populações sem fluxo gênico (Hey 1991), quanto em populações que sofreram um gargalo profundo extinguindo os haplótipos intermediários (Grant e Bowen 1998). Haplótipos raros ligados por poucos passos mutacionais a haplótipos centrais frequentes, como o encontrado nas linhagens B dos marcadores mitocondriais, evidenciam uma expansão populacional recente. Por outro lado, populações em formato de rede, com as frequências distribuídas entre mais haplótipos distantes entre si, indicam uma população grande e com história evolutiva mais longa, como observado para a linhagem A. A divergência de perfil dos haplogrupos mitocondriais é mais condizente com histórias evolutivas distintas do que

com a extinção de haplótipos intermediários por algum evento. Isso porque, ao sofrer um gargalo, os haplótipos que se mantêm na população, teriam um tempo de evolução igual entre si, e conseqüentemente um perfil de expansão semelhante, o que não ocorre nos nossos dados. O perfil da rede de haplótipos sugere que a linhagem A seja mais antiga do que a linhagem B. Para *Pomatomus saltatrix* no hemisfério norte, a presença de mais de uma linhagem com topologias e diversidades distintas também é atribuída a eventos históricos com diferentes períodos de separação das populações, principalmente períodos de glaciações e inter-glaciações (Miralles *et al.* 2014). Eventos demográficos de contração, recolonização e separação de áreas geográficas deixam marcas históricas na diversidade haplotípicas e nucleotídicas das populações naturais (Hewitt 2006).

Diferenças fixadas também nas seqüências do gene da rodopsina também sugerem uma divergência profunda entre essas linhagens. Isso porque a rodopsina está sob seleção purificadora e que, portanto possuem uma taxa de evolução menor. A utilização do marcador rodopsina algumas vezes não se mostrou informativo mesmo entre diferentes espécies (Cashner *et al.* 2011, Von der Heyden *et al.* 2011). Por outro lado, já foi reportado em peixes o indício de evolução do mesmo gene por seleção positiva (Lamurseau *et al.* 2009). Diferentes haplótipos do gene foram atribuídos a adaptações locais, visto que essa é uma proteína transmembrânica da retina, sensível a luminosidade (Hargrave 2001). Para os dois haplótipos mais comuns encontrados na rodopsina, somente uma das mutações foi não sinônima, ou seja, há mudança de pelo menos um aminoácido na molécula. O marcador utilizado é somente uma parte da proteína, e estudos mais aprofundados sobre a estrutura e fisiologia envolvida são necessários para inferir qualquer hipótese sobre a possibilidade da substituição não sinônima ter ou não efeito seletivo.

A concordância entre dois ou mais marcadores moleculares de diferentes naturezas implica estatisticamente que a história evolutiva desses fragmentos de DNA é a mesma história do grupo de organismos analisados. Segundo Avise (1987), a concordância entre genealogias de diferentes moléculas cresce conforme o tempo de isolamento das populações aumenta. Esse padrão observado para a rodopsina também descarta a hipótese de gargalo profundo na população inicial. A probabilidade de o acaso levar a coincidência entre marcadores por esse processo é muito baixa.

Essa divergência profunda entre as linhagens pode ter sido suficiente para restringir a reprodução entre elas em um segundo contato. A restrição do fluxo gênico pode ser também devida a adaptações ecológicas a diferentes locais e temperaturas. Como

é observado, as anchovas estão em maior proporção em locais distintos além de dois locais simultâneos de reprodução sugeridos (Haimovici e Krug 1996, Silvano e Begossi 2010). O comportamento ecológico filopátrico de machos e fêmeas a regiões específicas suportaria também os resultados obtidos nesse trabalho, mas não se tem estudos sobre esse aspecto na espécie.

As análises filogenéticas dos marcadores só obtiveram valores significativos de probabilidade posterior na disposição das anchovas do Brasil com relação às de outras partes do mundo no marcador mitocondrial *cyt b*. Ainda assim, as relações evolutivas observadas podem não ser verdadeiras. O enraizamento da árvore pode estar comprometido devido o grupo externo estar muito distante do agrupamento a ser analisado (Smith 1994). Uma das evidências é que, o grupo considerado como irmão da família Pomatomidae (Arripidae) em um trabalho recente (Miya *et al.* 2013) não obteve um valor significativo de suporte junto a *P. saltatrix* nas inferências. Isso ocorreu somente para o marcador rodopsina, mas no mesmo, entre as linhagens de anchova não obtivemos valores significativos de suporte. As relações evolutivas entre as linhagens são um problema difícil de resolver já que a espécie é monotípica da família. O tempo evolutivo estimado para o táxon também é alto. Tem-se registro fóssil de sua existência há 50 milhões de anos, com estimativa através de relógio molecular de até 75 milhões (Miya *et al.* 2013). Para casos como esse, é recomendável utilizar redes de haplótipos como inferências de relações entre linhagens ou árvores não enraizadas (Smith 1994).

5.4 Populações ou espécies?

As definições de populações são inúmeras, mesmo dentro de um mesmo contexto (Waples e Gaggiotti 2006). A mais utilizada é a que considera um grupo de organismos da mesma espécie que ocupa uma mesma região geográfica, e é coeso reprodutivamente de geração em geração (Futuyma 1998). Diversos são também os conceitos de espécie. Segundo Queiroz (2007), os diferentes conceitos, na realidade, são diferentes métodos de medir uma única unidade, a linhagem de uma metapopulação. A linhagem de organismos originários de um mesmo ancestral comum adquire todas as características dos conceitos de espécie progressivamente, quanto mais divergente se torna da espécie irmã. Os conceitos divergem no que diz respeito ao estágio de diferenciação de cada linhagem. Os caracteres divergentes se colocam em ordem crescente na comparação de dois grupos sendo alguns como: Formação de *cluster* genotípico, *Cluster* fenético (caracteres

quantitativos), diagnosticável (diferenças fixadas e qualitativas), coalescências exclusivas de alelos, monofiletismo recíproco, incompatibilidade reprodutiva e ecologia distinta. O conceito biológico de espécie proposto por Mayr (1963), de que espécies estão isoladas de outras reprodutivamente, é considerado por muitos como limitado, já que diversos organismos formam híbridos e que potencialmente a divergência pode ocorrer mesmo entre grupos de organismos com barreiras semipermeáveis ao fluxo gênico (Rieseberg *et al.* 2004; Hausdorf 2011). Podemos observar nos dados dessa dissertação alguns poucos casos onde a reprodução entre as duas linhagens provavelmente ocorreu (genótipos heterozigotos entre linhagens na rodopsina). Ainda assim, a reprodução de alguns poucos indivíduos por geração não se mostra capaz de diminuir as divergências. Apesar do potencial cruzamento, esse se mostra insuficiente para formar novamente um grupo coeso. O conceito de espécie e populações em alto grau de divergência não possui um limite claro.

A distância genética é usualmente adotada para metodologias utilizando fragmentos de DNA como ferramentas na delimitação de espécies (Templeton 1980). Alguns são baseados em distância genética dentro e fora dos clados e valores de suporte de ramos. Para as anchovas, as metodologias de identificação de espécies utilizadas com esses preceitos foram inconclusivas. Não mostraram evidências significativas para rejeitar a hipótese nula da presença de somente uma espécie dentro de *P. saltatrix* entre as localidades amostradas. Esses resultados se deram provavelmente devido as distâncias mínimas e máximas entre e dentro dos clados serem sobrepostas, apesar de existir evidência para um vale de divergência tanto nas sequências do citocromo b como das de citocromo oxidase I (Fig 14). Além disso, as distâncias não são comparáveis a um grupo externo, pois *P. saltatrix* é a única espécie da família. A família Arripidae é a mais próxima e possui quatro espécies. Em três delas, as distâncias entre linhagens mitocondriais se apresentam como até duas vezes menores do que observado entre as linhagens *P. saltatrix* (Moore 2012). Nas linhagens de *P. saltatrix* observou-se também nucleotídeos fixados para o gene nuclear da rodopsina enquanto que nenhuma diferença nucleotídica foi observada entre *introns* nucleares (supostamente de evolução mais rápida do que o *exon* da rodopsina estudado) dentro dessas três espécies do gênero *Arripis*. No entanto, um ponto que não deixa dúvidas, no caso das espécies do gênero *Arripis*, é que elas apresentam diferenças morfológicas claras (Moore 2012, Paulin 1993). O objetivo inicial desta dissertação era um trabalho de genética pesqueira, portanto, não foram feitas análises morfométricas ou morfológicas das amostras coletadas. A descoberta de uma diferenciação profunda entre as linhagens de anchova indica que será importante que tais análises sejam feitas sobre material separado geneticamente, para verificar se podem ser

encontradas diferenças morfológicas que corroborem a diferenciação das linhagens e que possam servir de base para uma diferenciação específica.

Devido à presença das anchovas em todo o mundo e as relações evolutivas se manterem controversas, é preferível em um cenário complexo como este, manter uma postura mais conservadora e sugerir as anchovas analisadas aqui não como espécies diferentes. Por outro lado, a separação profunda observada, e a correlação entre todos marcadores usados é maior do que seria atribuída a populações mendelianas. Com o presente estudo, no âmbito da genética da conservação, as linhagens de anchovas do Brasil devem ser classificadas como Unidades Evolutivamente significantes (ESUs, Ryder 1986). Diversos conceitos surgiram também para essa denominação, com Moritz *et al.* (1995) introduzindo o conceito de monofiletismo recíproco. Mas esse conceito foi criticado por Crandall *et al.* (2000) que enfatiza a importância ecológica da população. O termo foi unificado por Fraser e Bernatchez (2001) como “segmentos de espécies nos quais a divergência pode ser medida e avaliada com ênfase em diferentes papéis de forças evolutivas em variadas escalas temporais”. A unificação por esses autores tem como ponto principal a conservação da divergência genética adaptativa dentro da espécie. O fato das linhagens estarem claramente associadas a diferenças locais e de temperatura está de acordo com essa definição, pois engloba tanto a diferenciação de linhagens mitocondriais e nucleares, como a segregação ecológica.

5.5 Pesca

Para *P. saltatrix*, é a primeira vez que é reportada uma estruturação tão alta entre populações geograficamente tão próximas. É um cenário totalmente distinto do já reportado para a espécie em todo o mundo, levando em consideração que possui hábito migrador e esta distribuída em uma área de vida relativamente pequena e contínua (2.500 Km). Esse resultado tem implicações importantes para o manejo pesqueiro do recurso na costa Brasileira que está sendo sobre-explorado tanto no sul quanto no sudeste do Brasil (Silvano e Valbo-Jorgensen 2008, Silvano e Begossi 2009, Bender *et al.* 2014). A identificação de ESUs dentro da espécie ao longo da costa significa que as estatísticas pesqueiras e o cálculo de cotas de pesca deverão levar em conta não só a localidade geográfica, mas também a época do ano e, possivelmente, a profundidade.

Essas ESUs devem ser tratadas como estoques pesqueiros distintos, portanto são necessárias medidas preventivas como as que ocorrem na região sul (MPA, 2009) também sejam aplicadas no Sudeste do Brasil. Essa ESU mais ao norte possui uma diversidade gênica menor, conseqüentemente uma menor adaptabilidade a condições adversas (Reed e Frankham 2003). Esses dados associados aos observados em Bender *et al.* (2014) demonstram que essa ESU pode estar em serio risco, sendo necessárias medidas preventivas com urgência. Mas também, são necessários mais estudos que preencham lacunas do conhecimento, como exata época e locais de desova, inferências de taxa de crescimento para limitar corretamente o tamanho mínimo e máximo necessário de pesca, além de controle de quantidade de captura como ocorrem em outros países, visando uma exploração sustentável (Methot e Wetzel 2013).

6 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho pudemos concluir que as anchovas da costa brasileira estão profundamente estruturadas em duas Unidades Evolutivamente Significativas. Não parece existir uma barreira geográfica atual que as delimite, observando-se sobreposição entre elas (pelo menos no desembarque pesqueiro) por grande parte da costa brasileira, com exceção do Espírito Santo ao Rio de Janeiro, onde observou-se somente uma ESU. O padrão de estruturação é de uma separação histórica das linhagens, que mesmo com possibilidade de contato atual, permanecem estruturadas. Uma adaptação a condições locais em latitudes diferentes parece ser a barreira ecológica que mantém o fluxo gênico restrito entre elas, sendo que as condições oceanográficas da região parecem ter um papel importante. De fato, é possível que elas estejam em parapatria, convivendo ao longo da distribuição em massas de água contíguas, com eventual contato.

As linhagens de anchovas se mostraram com o mesmo padrão de migração sazonal: para latitudes menores no inverno, e para maiores no verão, mas atingindo regiões geográficas distintas. Não foi possível inferir limite entre as populações devido à grande movimentação e sobreposição, mas o litoral norte do estado de São Paulo mostrou ser o ponto de menor latitude que uma grande parcela da linhagem sul atinge nos meses mais frios.

O cenário evolutivo das populações requer análises mais refinadas para ser elucidado. Pequenas distâncias entre as linhagens, comparada a longas distâncias entre

Pomatomus saltatrix e a família mais próxima inviabilizaram a acurácia das inferências sobre serem ou não espécies distintas. Os dados obtidos nesta dissertação ainda serão utilizados para inferências demográficas que reconstruam o cenário evolutivo histórico das populações do Brasil no sentido de tempo de divergência, tamanho efetivo e taxas de migração entre as populações. Serão ainda realizadas novas análises filogenéticas concatenando os dados de sequências, que se mostraram com histórias evolutivas coincidentes, para verificar se resulta em uma inferência filogenética mais consistente.

O cenário inesperado obtido nesta dissertação, com uma separação entre populações ao longo de centenas de quilômetros de costa com um nível equivalente ao observado entre continentes diferentes, evoca várias outras perguntas e estratégias de investigação mais profundas desse peixe. Para que se possa investigar se são ou não espécies diferentes, deverão ser feitas análises morfológicas e morfométricas de animais separados molecularmente. Se tratarem-se de espécies diferentes, caberá questionar também a possível existência de outras espécies crípticas ao longo de toda sua distribuição. Para se verificar se as duas ESUs estão associadas a massas de água distintas, serão necessárias coletas georeferenciadas e com acompanhamento de dados oceanográficos. Para definir estratégias de manejo pesqueiro adequadas serão necessárias análises estatísticas coletadas levando-se em conta a separação entre as duas ESUs. Isso inclui também a análise separada dos dados de biologia reprodutiva e de crescimento para cada estoque.

7 Referências

- Aljanabi SM e Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.
- ASMFC (2015). Bluefish Benchmark stock Assessment for 2015. Em: NEFSC (Eds), 60th Northeast Regional Stock Assessment Workshop (60th SAW) Assessment Report. US Dept Commer, Northeast Fish Sci Cent Ref Doc. 15-08, pp. 335-870.
- Austin HM, Scoles D e Abell AJ (1999). Morphometric separation of annual cohorts within mid-Atlantic bluefish, *Pomatomus saltatrix*, using discriminant function analysis. *Fishery Bulletin*, 97(3), 411-420.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE *et al.* (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 489-522.
- Balloux F e Lugon-Moulin N (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11(2), 155-165.
- Bandelt HJ, Forster P e Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Bender MG, Machado GR, Silva PjdA, Floeter SR, Monteiro-Netto C, *et al.* (2014) Local Ecological Knowledge and Scientific Data Reveal Overexploitation by Multigear Artisanal Fisheries in the Southwestern Atlantic. *PLoS One*, 9(10): e110332.
- Benjamini Y e Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bohonak AJ (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology*, 21-45.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, v. 43, p. 223-225.
- Bonfil R, Meýer M, Scholl MC, Johnson R, O'Brien S, Oosthuizen H, *et al.* (2005). Transoceanic migration, spatial dynamics, and population linkages of white sharks. *Science*, 310(5745), 100-103.

- Borzone CA, Pezzuto PR e Marone E (1999). Oceanographic Characteristics of a Multi-Specific Fishing Ground of the Central South Brazil Bight. *Marine Ecology*, 20(2), 131-146.
- Bremer JA, Stéquer B, Robertson NW e Ely B (1998). Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Marine Biology*, 132(4), 547-557.
- Briggs JC (1960). Fishes of worldwide (circumtropical) distribution. *Copeia*, 3, 171-180.
- Burton RS (2009). Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. *Bioscience*, 59(10), 831-840.
- Cadrin SX (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(1), 91-112.
- Carvalho GR e Hauser L (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 326-350.
- Cashner MF, Piller KR e Bart HL (2011). Phylogenetic relationships of the North American cyprinid subgenus *Hydrophlox*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(3), 725-735.
- Castelao RM e Barth JA (2006). Upwelling around Cabo Frio, Brazil: The importance of wind stress curl. *Geophysical Research Letters*, 33(3), L03602.
- Cavalli-Sforza LL (1998). The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics*, 14(2), 60-65.
- IBAMA/CEPSUL (2009). Relatório sobre reunião técnica para o ordenamento da pesca de anchova (*Pomatomus saltatrix*) nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil. Itajaí, SC, 98p.
- Ceyhan T, Akyol O, Ayaz A e Juanes F (2007). Age, growth, and reproductive season of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Marmara region, Turkey. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 64(3), 531-536.
- Champagnat C (1983). Pêche, biologie et dynamique du tassergal (*Pomatomus saltator*, *Linnaeus, 1766*) sur les côtes sénégal-mauritaniennes. ORSTOM. (Vol. 168). 279p. Paris.

- Conover DO, Gilmore T e Munch SB (2003). Estimating the relative contribution of spring- and summer-spawned cohorts to the Atlantic coast bluefish stock. *Transactions of the American Fisheries Society*, 132(6), 1117-1124.
- Cowen RK e Sponaugle S (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1, 443-466.
- Craig MT, Graham RT, Torres RA, Hyde JR, Freitas MO, Ferreira BP *et al.* (2009). How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*, 7(3), 167-174.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 390–395.
- Cushing JE e Durall GL (1957). Isoagglutination in fish. *American Naturalist*, 91(857) 121-126.
- da Silva R, Veneza I, Sampaio I, Araripe J, Schneider H e Gomes G (2015). High levels of genetic connectivity among populations of yellowtail snapper, *Ocyurus chrysurus* (Lutjanidae–Perciformes), in the Western South Atlantic revealed through multilocus analysis. *PloS One*, 10(3), e0122173.
- de Ligny W (1969). Serological and biochemical studies on fish populations. *Oceanographic Marine Biology Annual Review*, 7, 411-513.
- De Queiroz K (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886.
- Deuel DG, Clark JR e Mansueti AJ (1966). Description of embryonic and early larval stages of bluefish, *Pomatomus saltatrix*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 95(3), 264-271.
- Dhieb K, Ghorbel M, Jarbouï O e Bouaïn A (2007). Exploitation status and stock assessment by pseudo-cohort analysis of the bluefish, *Pomatomus saltatrix*, in the Gulf of Gabes (Tunisia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(05), 1315-1319.
- Díaz-Jaimes P, Uribe-Alcocer M, Rocha-Olivares A, Garcia-de-Leon FJ, Nortmoon P e Durand DJ (2010). Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): the influence of large effective population size and recent dispersal on

- the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3), 1209-1218.
- Ditty JG e Shaw RF (1995). Seasonal occurrence, distribution, and abundance of larval bluefish, *Pomatomus saltatrix* (Family: Pomatomidae), in the northern Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 56(2), 592-601.
- Doherty PP (1991). Spatial and temporal patterns in recruitment. *Ecology of Coral Reef Fishes*, 261-293.
- Dos Santos SMR, Klopper AW, Oosthuizen CJ e Bloomer P (2008). Isolation and characterization of polymorphic tetranucleotide microsatellite loci in the pelagic perciform fish *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) from South Africa. *Molecular Ecology Resources*, 8(5), 1065-1067.
- Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavanagh RD, Kyne PM, Harrison LR, *et al.* (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife*, 3, e00590.
- Earl DA (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Ely B, Viñas J, Bremer JRA, Black D, Lucas L, Covello K, *et al.* (2005). Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 19.
- Evanno G, Regnaut S e Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier L e Lischer HE (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Falush D, Stephens M e Pritchard JK (2003). Inference of population structure using *multilocus* genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.

- Falush D, Stephens M e Pritchard JK (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578.
- Fisher RA (1918). The correlation between relatives on the supposition of Mendelian Inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52, 399-433.
- Fraser DJ e Bernatchez L (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10(12), 2741-2752.
- Futuyma DJ (1998) *Evolutionary Biology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 763p.
- Garrick DJ, Taylor JF e Fernando RL (2009). Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. *Genetics Selection Evolution*, 41(55), 10-1186.
- Glaubitz JC (2004). Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 309-310.
- Goodbred CO e Graves JE (1996). Genetic relationships among geographically isolated populations of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Marine and Freshwater Research*, 47(2), 347-355.
- Gordina AD (1996). On bluefish (*Pomatomus saltatrix* L.) spawning in the Black Sea. *Marine and Freshwater Research*, 47(2), 315-318.
- Goudet J (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Grant WAS e Bowen BW (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415-426.
- Graves JE (1998). Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89(5), 427-437.

- Graves JE, McDowell JR, Beardsley AM e Scoles DR (1992). Stock structure of the bluefish *Pomatomus saltatrix* along the mid-Atlantic coast. *Fishery Bulletin*, 90(4), 703-710.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, *et al.* (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 591-611.
- Gusmão J, Lazoski C e Solé-Cava AM (2005) Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus sp.*, *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda : Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28, 165-171.
- Gusmão J, Lazoski C, Monteiro FA e Solé-Cava AM (2006) Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology*, 149, 491-502.
- Haimovici M, Absalonsen L, Velasco G e Miranda LV (2006). Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração. *Série Documentos REVIZEE-SCORE SUL*, 2, 7. pp.77-85.
- Haimovici M. e Krug LC (1992). Alimentação e reprodução da enchova *Pomatomus saltatrix* no litoral Sul do Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, 52, 503-513.
- Haimovici M. e Krug LC (1996). Life history and fishery of the enchova, *Pomatomus saltatrix*, in southern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 47(2), 357-363.
- Haldane JBS (1924). A mathematical theory of natural and artificial selection. Part I. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 23, 19-41
- Hare JA (1993). Ecological and evolutionary implications of the larval transport and reproductive strategy of bluefish *Pomatomus saltatrix*. *Marine Ecology Progress Series*, 98, 1-16.
- Hargrave PA (2001). Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(1), 3-9.
- Hartl DL (1988). A primer of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, 221p.

- Hasegawa M, Kishino H e Yano TA (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160-174.
- Hausdorf B (2011). Progress toward a general species concept. *Evolution*, 65(4), 923-931.
- Hedger RD, Næsje TF, Cowley PD, Thorstad EB, Attwood C, Økland F *et al.* (2010). Residency and migratory behaviour by adult *Pomatomus saltatrix* in a South African coastal embayment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 89(1), 12-20.
- Hewitt G (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405 (6789), 907-913.
- Hey J (1991). The structure of genealogies and the distribution of fixed differences between DNA sequence samples from natural populations. *Genetics*, 128(4), 831-840.
- Holsinger KE e Weir BS (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 639-650.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M e Pritchard JK (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1322-1332.
- Hudson RR, Slatkin M e Maddison WP (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2), 583-589.
- Jackson JB, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, *et al.* (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, 293(5530), 629-637.
- Jakobsson M e Rosenberg NA (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- Juanes F, Hare JA e Miskiewicz AG (1996). Comparing early life history strategies of *Pomatomus saltatrix*: a global approach. *Marine and Freshwater Research*, 47(2), 365-379.

- Jukes TH e Cantor CR (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 3, 21-132.
- Kashi Y, King D e Soller M (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, 13(2), 74-78.
- Kim KS e Sappington TW (2013). Microsatellite data analysis for population genetics. *Methods in Molecular Biology*, 1006, 271-295.
- Krug LC e Haimovici (1989). Idade e crescimento da enchova *Pomatomus saltatrix* do Sul do Brasil. *Atlântica*, 11(1), 47-61.
- Lambert TC e Ware DM (1984). Reproductive strategies of demersal and pelagic spawning fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(11), 1565-1569.
- Larmuseau MH, Raeymaekers JA, Ruddick KG, Van Houdt JK e Volckaert FA (2009). To see in different seas: spatial variation in the rhodopsin gene of the sand goby (*Pomatoschistus minutus*). *Molecular Ecology*, 18(20), 4227-4239.
- Lazoski C, Gusmão J, Boudry P, Solé-Cava AM (2011). Phylogeny and phylogeography of commercially important Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Marine Ecology Progress Series* 426, 197-212.
- Le Gall J (1934). Le tassergeral ou blue fish (*Pomatomus saltatrix* lacépède= temnodon saltator linné). Résumé des connaissances acquises sur la biologie et l'utilisation de ce poisson. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 7(1), 27-85.
- Leigh GM e O'Neill MF (2004). Stock assessment of the Queensland-New South Wales tailor fishery (*Pomatomus saltatrix*). Department of Primary Industries and Fisheries. Brisbane, Queensland. 98p.
- Librado P e Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Linnaeus, C. (1766). *Systema naturae sive regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Laurentii Salvii, Holmiae. 12th ed. v. 1 (pt 1) 532 p.

- Lund Jr WA e Maltezos GC (1970). Movements and migrations of the bluefish, *Pomatomus saltatrix*, tagged in waters of New York and southern New England. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99(4), 719-725.
- Maggioni R, Rogers AD e Maclean N (2003). Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 12(12), 3213-3217.
- Maggs JQ, Mann BQ e van der Elst RP (2012). Long-term trends in the recreational shore-fishery for elf *Pomatomus saltatrix* (Pomatomidae) along the KwaZulu-Natal coast, South Africa. *African Journal of Marine Science*, 34(3), 401-410.
- Mayr E (1963). Animal species and evolution. Belknap Press, Cambridge,MA. 30p.
- Miller M, Pfeiffer W e Schwartz T (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 2010, 1-8. IEEE.
- Miller SA, Dykes DD e Polesky HFRN (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Miralles L, Juanes F e Garcia-Vazquez E (2014). Interoceanic Sex-Biased Migration in Bluefish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(5), 1308-1315.
- Miralles L, Juanes F, Pardiñas AF e Garcia-Vazquez E (2014). Paleoclimate Shaped Bluefish Structure in the Northern Hemisphere. *Fisheries*, 39(12),578-586.
- Miya M, Friedman M, Satoh TP, Takeshima H, Sado T, Iwasaki W *et al.* (2013). Evolutionary origin of the Scombridae (tunas and mackerels): members of a paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families. *PloS One*, 8(9), e73535.
- Moore G (2012). Aspects of the evolutionary history of a pair of fish species (Arripidae: Arripis): On either side of a biogeographic barrier in Southern Australian seas. Dissertação de Doutorado, Murdoch University.
- Moreira AA, Tomás ARG e Hilsdorf AWS (2011). Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 34-40.

- Methot RD e Wetzel CR (2013). Stock synthesis: A biological and statistical framework for fish stock assessment and fishery management. *Fisheries Research*, 142, 86-99.
- Moritz C, Lavery S e Slade R (1995). Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management (Eds Nielsen JL Powers GA). pp. 249-262. Symposium 17. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Morley JW, Buckel JA e Lankford Jr TE (2012). Relative contribution of spring-and summer-spawned bluefish cohorts to the adult population: effects of size-selective winter mortality, overwinter growth, and sampling bias. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(2), 233-244.
- Myers RA e Worm B (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature*, 423(6937), 280-283.
- Myers RA, Hutchings JA e Barrowman NJ (1997). Why do fish stocks collapse? The example of cod in Atlantic Canada. *Ecological Applications*, 7(1), 91-106.
- Narum SR (2006). Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 7(5), 783-787.
- Neigel JE (2002). Is F_{ST} obsolete?. *Conservation Genetics*, 3(2), 167-173.
- Nevo E (1978). Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13(1), 121-177.
- Nurthen RK, Cameron R e Briscoe DA (1992). Population genetics of tailor, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus)(Pisces: Pomatomidae) in Australia. *Marine and Freshwater Research*, 43(6), 1481-1486.
- Oliveira MEGC, Russo CA, Lazoski C, Vianna PRFG e Solé-Cava AM (2005). Genetic variation and population structure of two species of neo-tropical mud-mussels (*Mytella* spp). *Genetic Molecular Resource*, 4(2), 197-202.
- Ovenden JR., Berry O, Welch DJ, Buckworth RC e Dichmont CM (2015). Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. *Fish and Fisheries*, 16(1), 125-159.
- Paulin C (1993). Review of the Australian fish family Arripididae (Percomorpha), with the description of a new species. *Marine and Freshwater Research*, 44(3), 459-471.

- Pinsky ML, Jensen OP, Ricard D e Palumbi SR (2011). Unexpected patterns of fisheries collapse in the world's oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8317-8322.
- Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S e Achaz G (2012). ABGD, Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Rambaut A (2009). FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. *Website: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>*.
- Raymond M e Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248-249.
- Reed DH e Frankham R (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1), 230-237.
- Rieseberg LH, Church SA e Morjan CL (2004). Integration of populations and differentiation of species. *New Phytologist*, 161(1), 59-69.
- Rocha LA, Lindeman KC, Rocha CR e Lessios HA (2008). Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 918-928.
- Rodríguez-Rey GT, Solé-Cava AM e Lazoski C (2013). Genetic homogeneity and historical expansions of the slipper lobster, *Scyllarides brasiliensis*, in the south-west Atlantic. *Marine and Freshwater Research*, 65(1), 59-69.
- Ronquist F e Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138.
- Rosenberg NA, Burke T, Elo K, Feldman MW, Freidlin PJ, Groenen MA, *et al.* (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 159(2), 699-713.
- Ryder OA (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1(1), 9-10.

- Sanger F, Nicklen S e Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santa Brígida EL, Cunha DBD, Rego PSD, Sampaio I, Schneider H e Vallinoto M (2007). Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829)(Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4), 919-924.
- Santos S, Hrbek T, Farias IP, Schneider H e 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*, 15(14), 4361-4373.
- Santos S, Schneider H e 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*, 26(2), 151-161.
- Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Sevilla RG, Diez A, Norén M, Mouchel O, Jérôme M, Verrez-Bagnis V *et al.* (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 730-734.
- Shepherd GR, Moser J, Deuel D e Carlsen P (2006). The migration patterns of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) along the Atlantic coast determined from tag recoveries. *Fishery Bulletin*, 104(4), 559-570.
- Silvano RAM e Begossi A (2005). Local knowledge on a cosmopolitan fish: ethnoecology of *Pomatomus saltatrix* (Pomatomidae) in Brazil and Australia. *Fisheries Research*, 71(1), 43-59.
- Silvano RAM e Begossi A (2010). What can be learned from fishers? An integrated survey of fishers' local ecological knowledge and bluefish (*Pomatomus saltatrix*) biology on the Brazilian coast. *Hydrobiologia*, 637(1), 3-18.
- Silvano RAM e Valbo-Jorgensen J (2008). Beyond fishermen's tales: contributions of fishers' local ecological knowledge to fish ecology and fisheries management. *Environment, Development and Sustainability*. 10(5), 657-675.

- Silva-Oliveira GC, Rêgo PSD, Schneider H, Sampaio I e Vallinoto M (2008). Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper (*Epinephelus itajara*, Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4), 988-995.
- Smith AB (1994). Rooting molecular trees: problems and strategies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 51(3), 279-292.
- Smith W, Berrien P e Potthoff T (1994). Spawning patterns of bluefish, *Pomatomus saltatrix*, in the northeast continental shelf ecosystem. *Bulletin of Marine Science*, 54(1), 8-16.
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson MAX *et al.* (2007). Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience*, 57(7), 573-583.
- Stehlik LL (2009). Effects of seasonal change on activity rhythms and swimming behavior of age-0 bluefish (*Pomatomus saltatrix*) and a description of gliding behavior. *Fishery Bulletin*, 107(1), 1-12.
- Stephens M e Donnelly P (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73(5), 1162-1169.
- Stepien CA e Faber JE (1998). Population genetic structure, phylogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, 7(12), 1757-1769.
- Stramma L e England M (1999). On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978-2012), 104(C9), 20863-20883.
- Sunnucks P (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(5), 199-203.
- Sunyé PS e Servain J (1998). Effects of seasonal variations in meteorology and oceanography on the Brazilian sardine fishery. *Fisheries Oceanography*, 7(2), 89-100.

- Suzuki A, Shimizu Y e Morio T (1958). Serological studies of the races of tuna. I. The fundamental investigations and the blood groups of albacore. *Report, Nankai Regional Fisheries Research Laboratory*. 8, 104-116.
- Swain DP e Foote CJ (1999). Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 43(1), 113-128.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M e Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Templeton A (2002). Out of Africa again and again. *Nature*, 416(6876), 45-51.
- Templeton AR (1980). Modes of speciation and inferences based on genetic distances. *Evolution*, 34(4), 719-729.
- Thompson JD, Higgins DG e Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Thorpe JP, Solé-Cava AM e Watts PC (2000). Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia*, 420(1), 165-184.
- Turan C, Oral M, Öztürk B e Düzgüneş E (2006). Morphometric and meristic variation between stocks of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and northeastern Mediterranean Seas. *Fisheries Research*, 79(1), 139-147.
- Utter FM (1991). Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology*, 39, 1-20.
- Valdez J e Aguilera O (1987). Los Peces del Golfo de Venezuela. *Conicit, Fondo Editorial, Caracas*. 215 p.
- Valentin JL (2000). The Cabo Frio upwelling system, Brazil. (Eds.) Seeliger U e Kjerfve B. *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*, (144). Berlin. pp.97-104.
- Van der Elst R (1976). Game Fish of the East Coast of Southern Africa 1. The Biology of the Elf, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus), in the Coastal Waters of Natal. *South African Association for Marine Biological Research Investigational Report*, (44). 59p.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP e Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- Vasconcellos AV, Lima D, Bonhomme F, Vianna M e Solé-Cava AM (2015). Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: The whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Fisheries Research*, 167, 333-337.
- Vasconcellos AV, Vianna P, Paiva PC, Schama R e Solé-Cava A (2008). Genetic and morphometric differences between yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*, Lutjanidae) populations of the tropical West Atlantic. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 308-316.
- Vaz-dos-Santos AM, Rossi-Wongtschowski CLDB e Figueiredo JLD (2009). *Merluccius hubbsi* (Teleostei: Merlucciidae): stock identification based on reproductive biology in the south-southeast brazilian region. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57(1), 17-31.
- Villela LB (2013) Estruturação genética populacional da Anchova, *Pomatomus saltatrix* (Linneus, 1766), na costa brasileira empregando marcadores moleculares. Monografia de Graduação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Viñas J, Bremer JÁ e Pla C (2004). Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Marine Biology*, 145(2), 225-232.
- Voloch CM e Solé-Cava AM (2005). Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. *Genetics and Molecular Biology*, 28(2), 254-257.
- Von der Heyden S, Bowie RCK, Prochazka K, Bloomer P, Crane NL e Bernardi G (2011). Phylogeographic patterns and cryptic speciation across oceanographic barriers in South African intertidal fishes. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(11), 2505-2519.
- Von der Heyden, S., Bowie, R. C. K., Prochazka, K., Bloomer, P., Crane, N. L., & Bernardi, G. (2011). Phylogeographic patterns and cryptic speciation across oceanographic barriers in South African intertidal fishes. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(11), 2505-2519.

- Waples RS (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89(5), 438-450.
- Waples RS e Gaggiotti O (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15(6), 1419-1439.
- Ward RD e Grewe PM (1994). Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(3), 300-325.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR e Hebert PD (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Ward TM, Staunton-Smith J, Hoyle S e Halliday IA (2003). Spawning patterns of four species predominantly temperate pelagic fishes in the sub-tropical waters of southern Queensland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56(5), 1125-1140.
- Wilk SJ (1977). Biological and Fisheries Data on Bluefish, *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus). Technical Series Report. National Marine Fisheries Service, 11. Highlands. 56p.
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, *et al.* (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314(5800), 787-790.
- WRFP 2010. Status of fisheries resources in NSW 2008/09. Tailor. Sydney. pp.333-336.
- Wright S (1930). The genetical theory of natural selection a review. *Journal of Heredity*, 21(8), 349-356.
- Wright S (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(1), 323-354.
- Young GC, Wise BS e Ayvazian SG (1999). A tagging study on tailor (*Pomatomus saltatrix*) in Western Australian waters: their movement, exploitation, growth and mortality. *Marine and Freshwater Research*, 50(7), 633-642.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P e Stamatakis A (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

8 Anexos

Anexo I

Sequência do *GenBank* utilizadas nas análises filogenéticas.

	COI	cit b	Rod
Espécie	Código <i>GenBank</i>		
<i>Arripis georgianus</i>	EF609289.1		
<i>Arripis trutta</i>	EF609290.1	AB205474.1	JX049174.1
<i>Arripis truttaceus</i>	EF609291.1		
<i>Brama australis</i>		FJ435626.1	
<i>Brama brama</i>	KJ204732.1	EF427543.1	DQ197835.1
<i>Brama dussumieri</i>	KF461140.1		
<i>Brama japonica</i>	JQ354022.1	AP005998.1	
<i>Brama orcini</i>	KF489508.1		
<i>Caristius macropus</i>	GU440263.1	AP005999.1	
<i>Eumegistus illustris</i>	NC022485.1	AP012497.1	
<i>Paracaristius maderensis</i>	EU148108.1		
<i>Pteraclis aesticola</i>	NC022487.1	AP012499.1	
<i>Pterycombus brama</i>	GU225019.1		EU638001.1
<i>Pterycombus petersii</i>	KF489737.1		
<i>Taractes asper</i>	GU440550.1	AP012498.1	
<i>Taractes rubescens</i>	JF952875.1		
<i>Taractichthys steindachneri</i>	KC970511.1		
<i>Taractichthys longipinnis</i>	AB639845.1	EF392625.1	EF427521.1
<i>Xenobrama microlepis</i>	EF609495.1		

Anexo II

A) Genótipos observados no alinhamento do gene rodopsina de *P. saltatrix*.

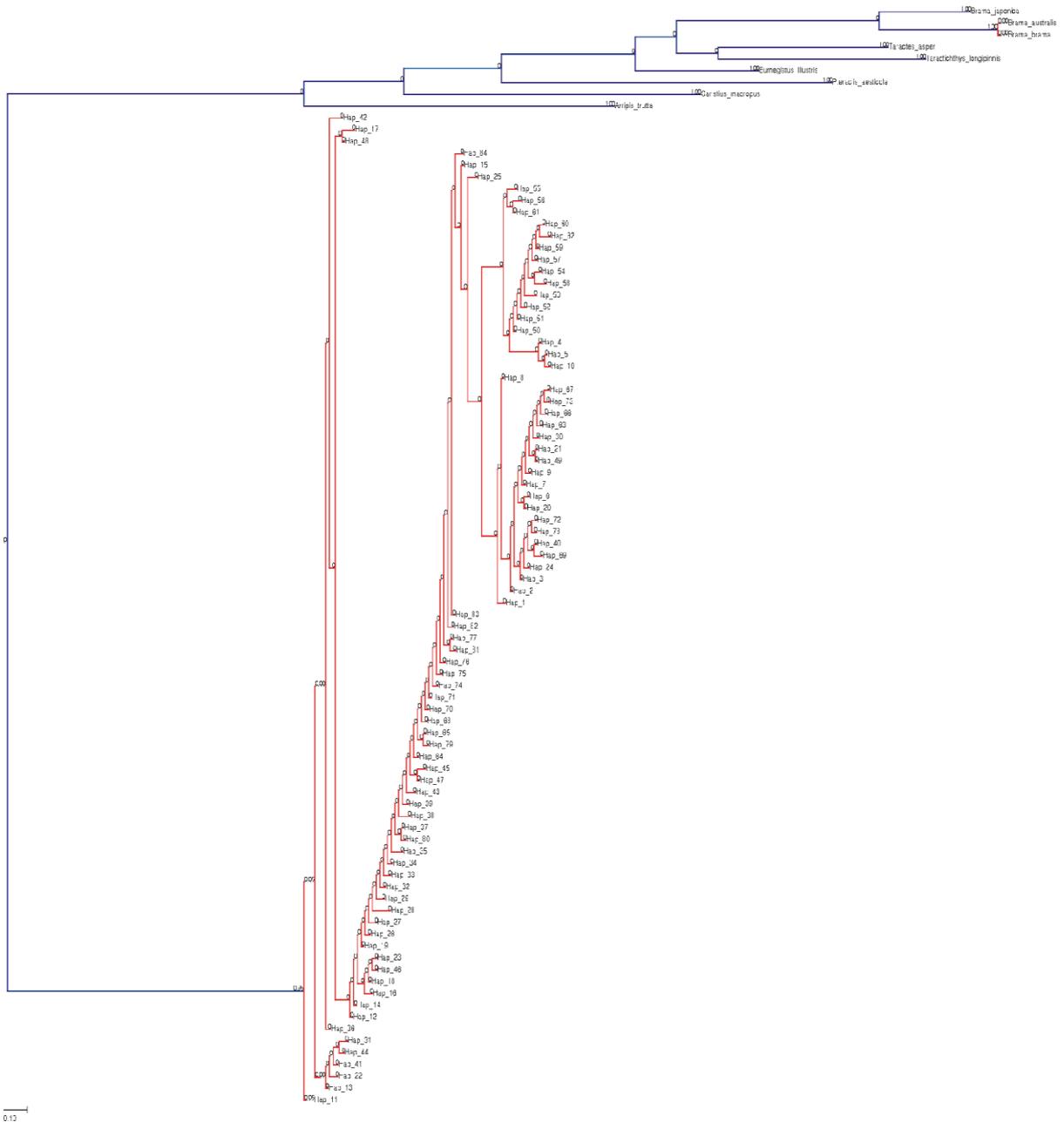
Posição no alinhamento			Genótipos observados
6	11	116	
A	C	C	AA
G	T	T	BB
G	C	T	CC
G	T	C	DD
R	Y	Y	A/B
G	T	Y	B/D
G	Y	T	C/D

B) Distribuição dos genótipos do gene rodopsina observados em *P. saltatrix* por localidade.

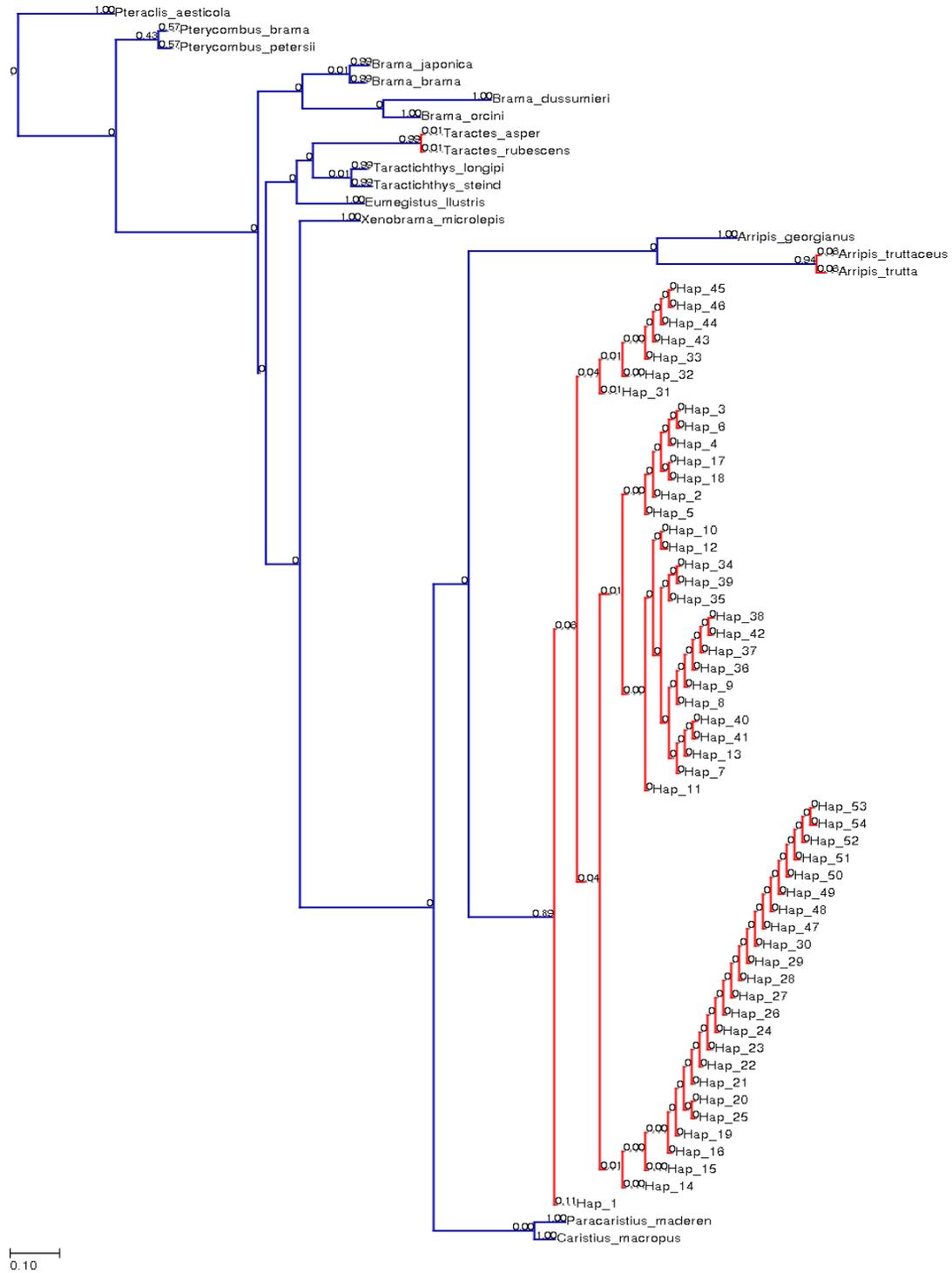
Localidade	N	Genótipos						
		AA	BB	CC	DD	A/B	B/D	C/D
ES	11	-	11	-	-	-	-	-
MAC-RJ	6	1	4	-	-	1	-	-
RJA-RJ	34	1	32	-	1	1	-	-
SP-N-OUT	7	1	6	-	-	-	-	-
SP-N-PRI	32	21	9	-	-	2	-	-
SP-N-INV	15	10	3	-	-	2	-	-
SP-S-PRI	34	16	14	-	-	4	1	-
SP-S-INV	3	3	-	-	-	-	-	-
FLO-SC	12	6	5	-	-	1	-	-
STA/CHUI	39	34	4	-	-	1	-	-
Brasil	193	93	88	-	1	12	1	-
NE. ATL/	6	-	-	6	-	-	-	-
MED								
EUA	30	-	-	29	-	-	-	1
Total	229	93	88	35	1	12	1	1

Anexo III

A) Análise bPTP do gene Cit b para identificação de possíveis espécies para *P. saltatrix* e grupo externo. Em vermelho os grupos com baixa probabilidade posterior ou com distância gênica baixa, considerados como uma única espécie e os terminais em azul considerado como espécies diferentes.

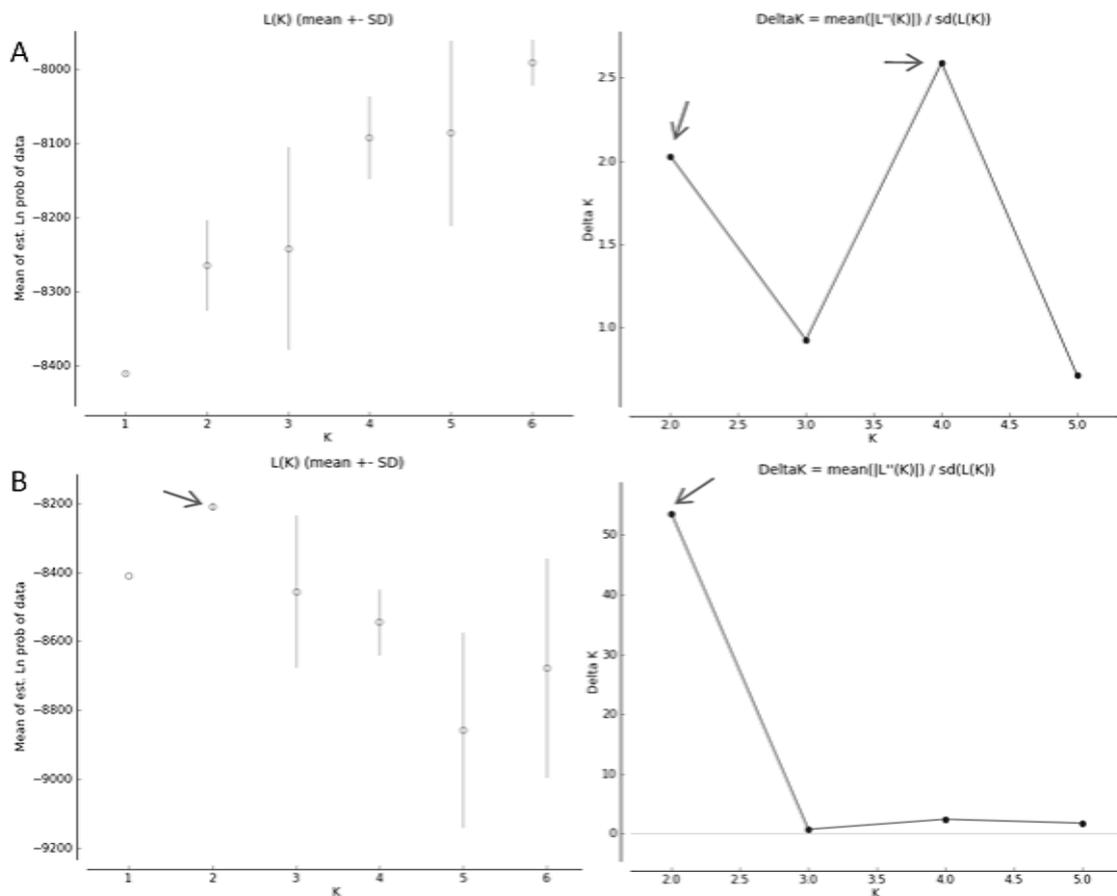


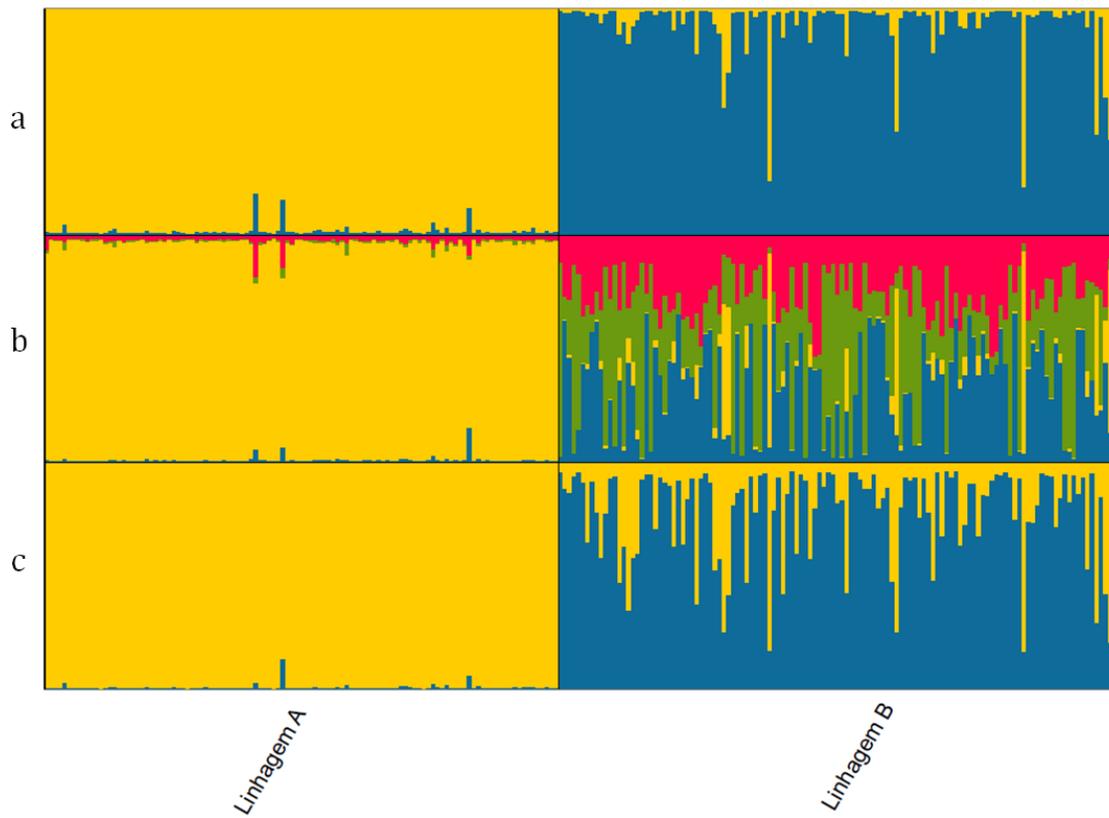
B) Análise bPTP do gene COI para identificação de possíveis espécies para *P. saltatrix* e grupo externo. Em vermelho os grupos com baixa probabilidade posterior ou com distância gênica baixa, considerados como uma única espécie e os terminais em azul considerado como espécies diferentes.



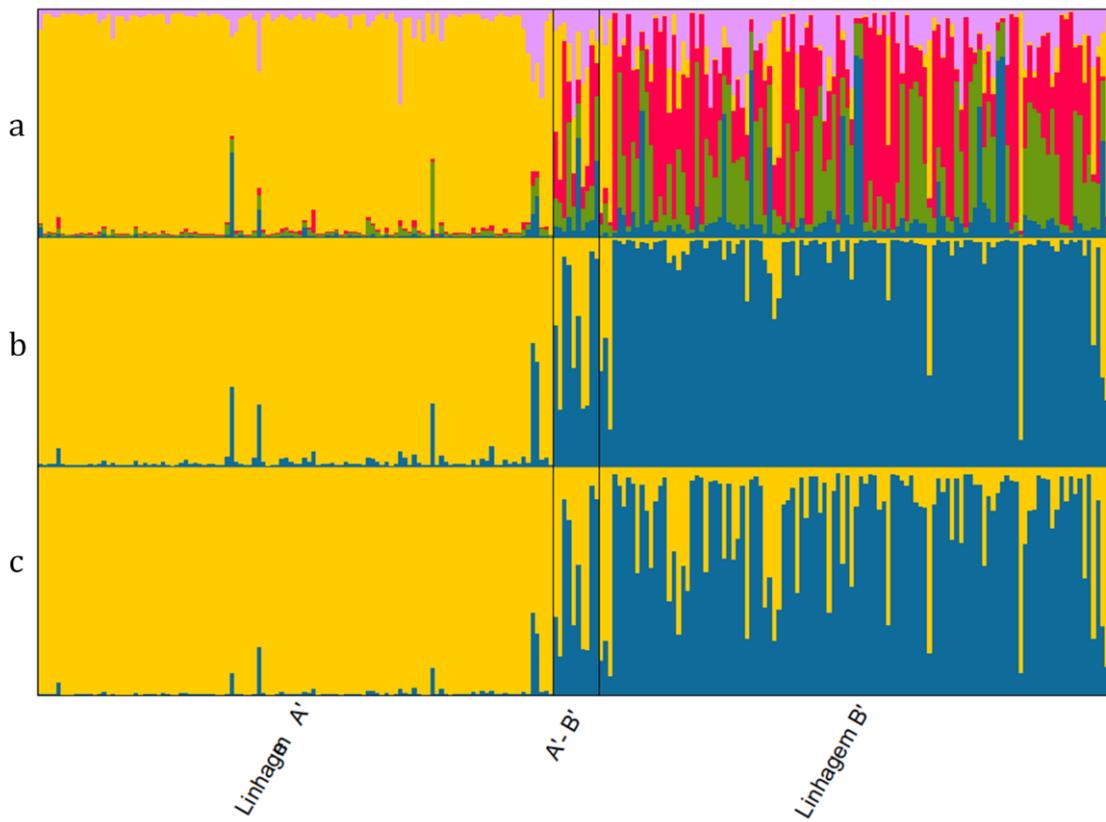
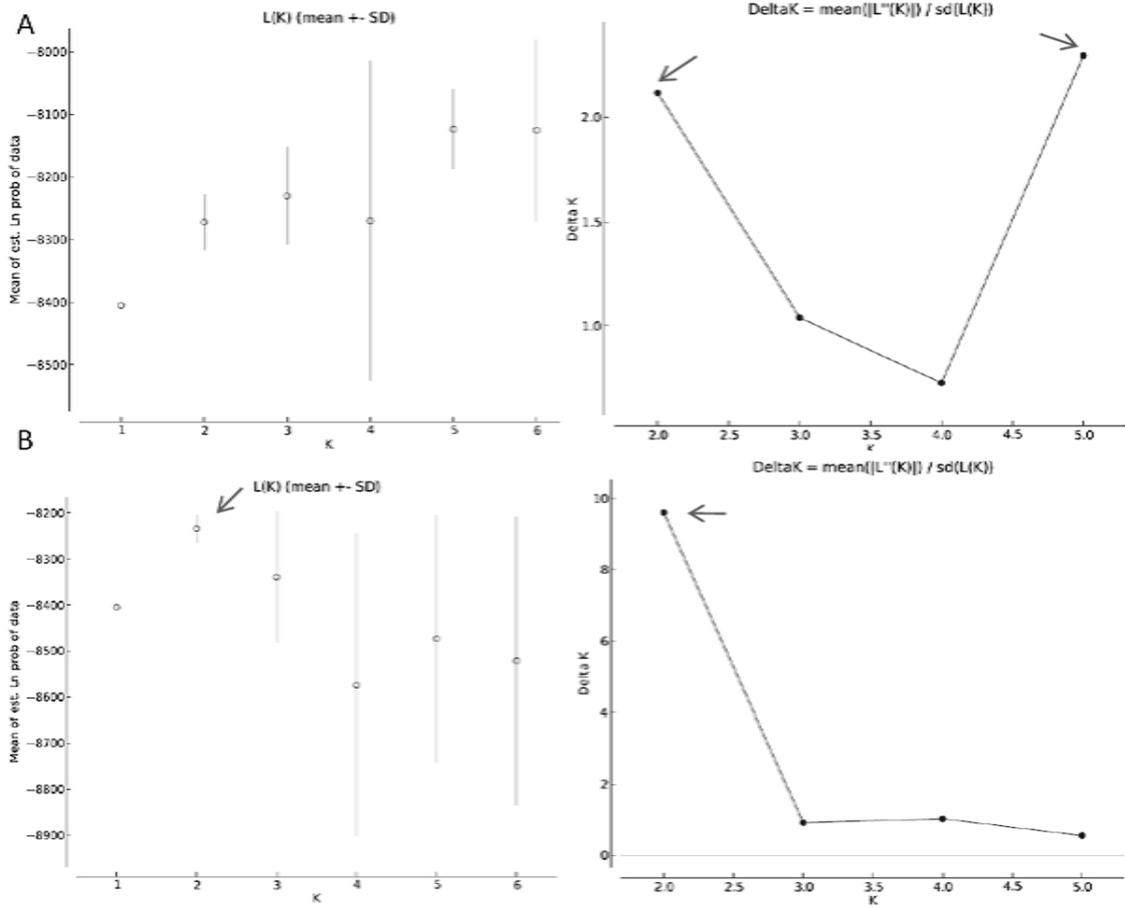
Anexo IV) Resultados das corridas de microssatélites no programa STRUCTURE realizadas com *prior* de grupos obtidos no marcadores mitocondriais com frequências correlacionadas e frequências não correlacionadas. Os gráficos de media de K (LnP(D)) e de Delta K para a) Frequências correlacionadas e b) Frequências não correlacionadas.

Seguidos pelos gráficos de barras de valor Q dessas corridas. A e B Referentes as corridas de frequências correlacionadas com K 2 e 4 respectivamente. C é referente a corrida com frequências não correlacionadas de K 2.





Anexo V) Resultados das corridas de microssatélites no programa STRUCTURE realizadas com *prior* de grupos obtidos no marcador rodopsina com frequências correlacionadas e frequências não correlacionadas. Os gráficos de média de K (LnP(D)) e de Delta K para A) Frequências correlacionadas e B) Frequências não correlacionadas. Seguidos pelos gráficos de barras de valor Q dessas corridas. Gráficos a e b referentes às corridas de frequências correlacionadas com K 2 e 4 respectivamente, e c referente a corrida com frequências não correlacionadas de K 2.



Anexo VI) Tabelas de contingências

Haplogrupos Mt DNA X rodopsina

		OBSERVADOS		
		rodopsina		
		A	B	Σ
Mt DNA	A	93	13	106
	B	8	84	92
	Σ	101	97	198

		ESPERADOS	
		rodopsina	
		A	B
Mt DNA	A	54,1	51,9
	B	46,9	45,1

$(O-E)^2/E$		
	A	B
A	28	29,2
B	32,3	33,6

$\Sigma = X^2$ 123,2

GL=1

P<0,005

Haplogrupos Mt DNA X Microsatélites STRUCTURE (F correlacionadas, *Prior*)

		OBSERVADOS		
		Microsatélites		
		A	B	Σ
Mt DNA	A	117	5	122
	B	0	102	102
	Σ	117	107	224

		ESPERADOS	
		Microsatélites	
		A	B
Mt DNA	A	63,7	58,3
	B	53,3	48,7

$(O-E)^2/E$		
	A	B
A	44,5	48,7
B	53,3	58,3

$\Sigma = X^2$ 204,8

GL=1

P<0,005

Haplogrupos rodopsina X microsatélites STRUCTURE (F correlacionadas *Prior*)

		OBSERVADOS			
		Msat			
		A	B	AB	Σ
Rho	A	102	7	3	112
	B	0	112	2	114
	AB	5	3	2	10
	Σ	107	122	7	236

		ESPERADOS		
		Msat		
		A	B	AB
Rod	A	50,8	57,9	3,3
	B	51,7	58,9	3,4
	AB	4,5	5,2	0,3

$(O-E)^2/E$			
	A	B	AB
A	51,7	44,7	0,03
B	51,7	47,8	0,6
AB	0,05	0,9	9,8

$\Sigma = X^2$ 207,2

GL=2

P<0,005

Anexo VII) Figura retirada de Sunyé e Servain 1998. Distribuição horizontal de massas d'água na Baía Sul do Brasil no Verão (Janeiro – Fevereiro) na a) superfície e b) profundidade de 50m, e durante o inverno (Julho a Agosto) na c) superfície e d) profundidade de 50m. CW, Águas Costeiras; SACW, Águas centrais do Atlântico Sul; SAW, Águas Sub-Antárticas; SW, Águas de Plataforma; TW, Águas Tropicais.

