

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

***Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766)
(Perciformes: Carangidae): um complexo de
espécies?**

JULIA CRISTINA CASTILHO

CLÁUDIO DE OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção de Bacharel em Ciências
Biológicas.

BOTUCATU – SP
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Castilho, Julia Cristina.

Chloroscombrus chrysurus (Linnaeus, 1766) (Perciformes: Carangidae) : um complexo de espécies? / Julia Cristina Castilho. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cláudio de Oliveira

Coorientador: Najila Nolie Catarine Dantas Cerqueira

Capes: 20202008

1. DNA. 2. Peixes - Identificação. 3. Peixes marinhos.

Palavras-chave: DNA; Identificação molecular ; Peixe marinho

Agradecimentos

Agradeço muito a todos meus familiares e amigos que fizeram parte de minha trajetória durante a graduação, pois sem o apoio de vocês eu não teria concluído a faculdade. Em especial eu gostaria de agradecer aos meus pais, Paulo César Castilho e Suzana C. Possignolo Castilho, que deram o maior suporte que um filho poderia ter ao longo dessa difícil etapa e sempre me incentivaram. Agradeço também minha irmã Isabela F. Castilho pela amizade e compartilhamento de tantos momentos únicos e ao meu namorado Victor Carminatti que foi de extrema importância durante toda minha formação.

Agradeço também aos meus amigos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes por todos os ensinamentos e todas as conversas que tivemos ao longo desses anos. Agradeço a Mariana Kuranaka pela ajuda nas técnicas de laboratório, ao meu orientador Cláudio de Oliveira pela confiança, ensinamentos e incentivos desde o início no laboratório e por sempre atender o mais rápido possível e também a minha co-orientador Najila Nolie Catarine Dantas Cerqueira por todo ensinamento, compreensão, auxílio e carinho.

A todos os amigos que conheci durante esses anos de graduação e que eu espero levar comigo para sempre, em especial minha família encontrada em Botucatu: republica Manga Rosa, Lucas Jacomassi, Andre Balbino, Josiane Viveiros. E todos os demais que compartilharam e foram essenciais na minha jornada.

Também agradeço aos meus professores da graduação por todo o meu aprendizado e aos meus colegas de sala por fazerem parte de minha formação e companheirismo.

A todos, enfim, que direta ou indiretamente contribuíram para o andamento e finalização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

O Brasil é detentor da maior diversidade biológica do planeta, contando com 10% a 20% do número total de espécies mundiais. Grande parte dessa diversidade se encontra distribuída em biomas terrestres, porém, muito pouco se conhece sobre as áreas de endemismo da biodiversidade marinha no Brasil. Por outro lado, a porção tropical do Atlântico Sul Ocidental, incluindo a Zona Econômica Exclusiva Brasileira (ZEE) é uma das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade marinha no oceano Atlântico. A família Carangidae é constituída por cerca de 150 espécies, pertencentes a 30 gêneros, distribuídas nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. A palombeta, *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766), é uma espécie de peixe teleósteo da ordem Perciformes, família Carangidae, de hábitos pelágico-demersal que se encontra distribuída no Atlântico Ocidental de Massachusetts (EUA) à Argentina e no Atlântico Oriental da Espanha à Angola. O Código de Barras por DNA (DNA *barcoding*) é uma metodologia desenvolvida para a identificação de espécies a partir de amostras de material genético. Uma análise preliminar de 29 amostras com sequências disponíveis em bancos de dados públicos mostra que existem 3 linhagens nessa espécie, sendo duas encontradas no Brasil. O presente projeto pretendeu testar a hipótese de que existem duas linhagens de *C. chrysurus* no Brasil e verificar seu grau de isolamento através da análise de DNA *barcoding* de amostras coletadas no litoral do Brasil, do Amapá até Santa Catarina.

Abstract

Brazil has the greatest biological diversity on the planet, accounting for 10% to 20% of the total number of world species. Much of this diversity is distributed in terrestrial biomes, however, very little is known about the areas of endemism of marine biodiversity in Brazil. On the other hand, the tropical portion of the Western South Atlantic, including the Brazilian Exclusive Economic Zone (EEZ) is one of the priority areas for the conservation of marine biodiversity in the Atlantic Ocean. The Carangidae family is made up of around 150 species, belonging to 30 genera, distributed in the Atlantic, Indian and Pacific oceans. The palmetto, *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766), is a species of teleost fish of the order Perciformes, family Carangidae, with pelagic-demersal habits that is distributed in the Western Atlantic from Massachusetts (USA) to Argentina and in the Eastern Atlantic from Spain to Angola. DNA barcoding is a methodology developed for identifying species from samples of genetic material. A preliminary analysis of 29 samples with sequences available in public databases shows that there are 3 lineages in this species, two of which are found in Brazil. The present project aims to test the hypothesis that there are two lineages of *C. chrysurus* in Brazil and verify their degree of isolation through DNA barcoding analysis of samples collected on the coast of Brazil, from Amapá to Santa Catarina.

1.1. Introdução

A espécie *Chloroscombrus chrysurus*, conhecida popularmente como palombeta, é uma espécie de peixe teleósteo da família Carangidae. Essa família apresenta 30 gêneros com cerca de 150 espécies e possui hábitos pelágico-demersal com distribuição no Atlântico Ocidental de Massachusetts (EUA) à Argentina e no Atlântico Oriental da Espanha à Angola. Tais peixes são comuns nos mares do Sudeste do Brasil, principalmente em baías e estuários, chegando a medir até 30 cm de comprimento (Cunha et al., 1980).

No presente estudo utilizamos 34 sequências disponíveis no banco de dados Bold Systems da espécie *Chloroscombrus chrysurus* da América do Norte, Central e do Sul e também da Nigéria, que determinou a possível ocorrência de duas linhagens para o Atlântico, indicando assim, a possibilidade de um isolamento geográfico dessas linhagens. As hipóteses sugeriam que no Brasil poderia haver pelo menos duas linhagens de *Chloroscombrus chrysurus*. O objetivo deste trabalho foi identificar molecularmente os espécimes de *Chloroscombrus chrysurus*, através da metodologia DNA barcoding e testar a hipótese da possível ocorrência de duas linhagens de *C. chrysurus* na costa do Brasil, sendo assim necessário também o uso do marcador D-LOOP posteriormente. Esse estudo é de grande importância para estudos de conservação e entendimento da evolução da espécie.

2. Realizações no período

2.1. Material e métodos

2.1.2 Material

No presente momento dispomos, em nossa coleção, de 35 lotes (96 tecidos) de *Chloroscombrus chrysurus* (**Tabela 1**) (**Figura 1**) provenientes de quase toda a costado Brasil, do Amapá até Santa Catarina. Como material comparativo temos também amostras de *Chloroscombrus orqueta*, coletados no litoral do Peru. Os materiais foram coletados e estão armazenados conforme autorização permanente de coleta e manutenção emitida pelo Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) em nome do Dr. Claudio de Oliveira (licença número: 13843-3).

Tabela 1. Relação de material disponível de *Chloroscombrus chrysurus* na coleção LBP.

LBP	N	Localidade	Coordenadas	Município/Estado
11907	2	Oceano Atlântico	-24.055 -46.341	Santos/SP
19998	5	Enseada de Mucuripe	S 03°41'33.0" W 38°30'18.0"	Fortaleza/CE
20005	5	Praia de Toque Toque Pequeno	S 23°49'25.0" W 45°32'11.0"	São Sebastião/SP
20555	4	Praia Central	S 26°59'50.7" W 48°37'20.0"	Balneário Camboriú/SC
20582	3	Praia Central	S 26°59'50.7" W 48°37'20.0"	Balneário Camboriú/SC
21424	5	Baia da Guanabara	S 22°56'59.0" W 46°25'50.0"	Rio de Janeiro/RJ
23027	1	Estuário Bragantino		Bragança/PA
23153	1	Povoado de Sauacuhy		Paripueira/AL
23168	2	Praia de Jatiúca		Maceió/AL
23225	2	Praia do Morgado		Acaraú/CE
23730	3	Litora do Pará	S 23°26'00.8" W 45°01'01.7"	Belém/PA

23817	6	Litoral Valença	S 13°22'22.1" W 38°58'43.0"	Valença/BA
24126	5	Oceano Atlântico	S 20°19'00.1" W 40°15'37.0"	Vitória/ES
24191	2	Oceano Atlântico	S 20°48'28.2" W 49°39'08.7"	Anchieta/ES
25176	5	Sudeste da ilha dos Lobos	S 29°30'57.0" W 49°15'02.0"	Torres/RS
26992	1	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 03°45'24.0" W 50°18'58.0"	Soure/PA
26995	1	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 02°15'55.0" W 48°34'14.0"	Soure/PA
26997	1	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 02°17'56.0" W 48°26'17.0"	Soure/PA
27186	3	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 01°09'13.0" W 47°51'55.0"	Pará
27187	1	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 01°09'13.0" W 47°51'55.0"	Pará
27188	2	Ao largo dos recifes Amazônicos	N 01°48'10.0" W 48°21'34.0"	Pará
27380	1	Povoado de Sauacuhy		Paripueira/AL
27424	2	Praia da Jatiúca		Maceió/AL
27579	1	Estuário Bragantino		Bragança/PA
27647	2	Praia do Morgado		Acaraú/CE
27749	1	Pesca de arrasto	N 01°33'00.0" W 48°21'00.0"	Amapá
27769	2	Pesca de arrasto	N 01°23'00.0" W 48°06'00.0"	Amapá
27964	1		N 02°06'00.0" W 48°30'00.0"	Amapá
28020	1		N 02°06'00.0" W 48°30'00.0"	Amapá

28636	6	Praia de Cabedelo	S 06°57'48.0" W 34°49'05.0"	João Pessoa/PB
28807	1	Recifes Amazônicos	N 03°58'30.0" W 50°17'17.0"	Belém/PA
28899	7	Recifes Amazônicos	N 03°06'25" W 49°38'20"	Belém/PA
28991	5	Recifes Amazônicos	N 03°56'15" W 50°16'13"	Belém/PA
29106	1	Atlântico	S 23°30'25" W 45°05'37'	Ubatuba/SP
30228	5	Praia Toque-Toque Pequeno	S 23°49'25.0" W 45°32'11.0"	São Sebastião/SP

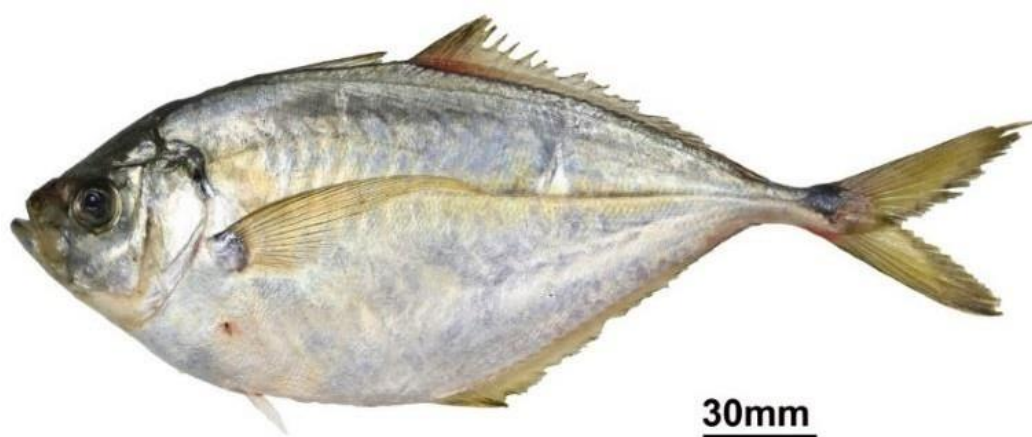


Figura 1. Exemplar de *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766). Imagem:Matheus M. Rotundo.

2.2. Métodos

2.2.1. Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído dos tecidos utilizando o DNeasy Tissue Kit (Qiagen), seguindo instruções do fabricante.

2.2.2. Amplificação do DNA por PCR

O DNA foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) e *Displacement Loop* (D-LOOP), amplificadas separadamente, foram obtidas através de reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers descritos por Ward *et al.* (2005) e por primers desenhados em nosso laboratório e ainda não publicados. As amplificações foram realizadas em um volume total de 12.5 µL com 1.25 µL de 10X tampão (10 mM Tris-HCl+15 mM MgCl₂), 0.5 µL dNTPs (200 mM de cada), 0.5 µL de cada primer (5 mM), 0.05 µL Platinum® TaqPolymerase (Invitrogen), 1 µL DNA genômico (12 ng) e 8.7 µL de ddH₂O. Foi utilizada no PCR um mix contendo 4 µL de primers (F2 e R2 - COI) e (F4 862932 e R4 862932 – D-LOOP). Após a realização da mistura, foram utilizados 10,5 µL de mix e 2 µL de DNA provenientes da extração. As reações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems utilizando o ciclo de amplificação da **tabela 2**.

Tabela 2: Descrição do ciclo de amplificação utilizada para amplificação do DNA

Etapa	Temperatura	Tempo
1	95°C - Desnaturação inicial	5 minutos
	95°C — Desnaturação cadeia	30 segundos
2 – Esse passo foi repetido 30X	52°C — hibridização primers	30 segundos
	72°C — Extensão nucleotídeos	30 segundos
3	72°C - Extensão final	10 minutos
	12°C	∞

Após o PCR, a qualidade dos produtos da PCR foi visualizada em gel de agarose a 1%.

2.2.3. ExoSap

Os produtos de PCR purificados foram utilizados em uma reação de sequenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

2.2.4. Sequenciamento

Logo após o produto da PCR ser purificado pela exosap, ele passou novamente por precipitação em EDTA/Acetato de sódio/etanol e submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger *et al.* (1977) em um sequenciador ABI3500 da Applied Biosystems disponível no Instituto de Biotecnologia da UNESP, campus de Botucatu.

3. Resultados

3.1. EXTRAÇÃO

Inicialmente estavam disponibilizados 35 lotes (96 tecidos) de *Chloroscombrus chrysurus* provenientes de quase toda a costa do Brasil. A etapa da extração foi dividida em três grupos contendo 32 amostras. Para cada grupo, foi feita uma extração em dia diferente, seguindo as etapas da mesma maneira para todos os grupos. A extração foi feita seguindo todos os passos do protocolo. Para o primeiro grupo, 4 das amostras não estavam em boas condições, dessa maneira, foram deixados de lado em primeiro momento, totalizando o grupo um com 28 amostras. O segundo e terceiro grupo tinham todos os exemplares em bom estado e foram utilizados, mantendo assim a quantidade exata de 32 tecidos do grupo.

3.2. PCR

3.2.1. Inicialmente, a primeira PCR foi feita com DNA da extração seguindo a ordem de conclusão de cada um dos grupos de 32 amostras. Os moldes para efetivação das amplificações foram realizados de acordo com o protocolo de PCR, com volumes pré-definidos e com a utilização inicial dos primers R2 e F2. As reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems.

Após a amplificação do termociclador a qualidade dos produtos da PCR foi observada em gel de agarose a 1%. O primeiro grupo foi o primeiro a ser testado obtendo uma ótima qualidade, como evidencia a imagem (**Figura 2**).

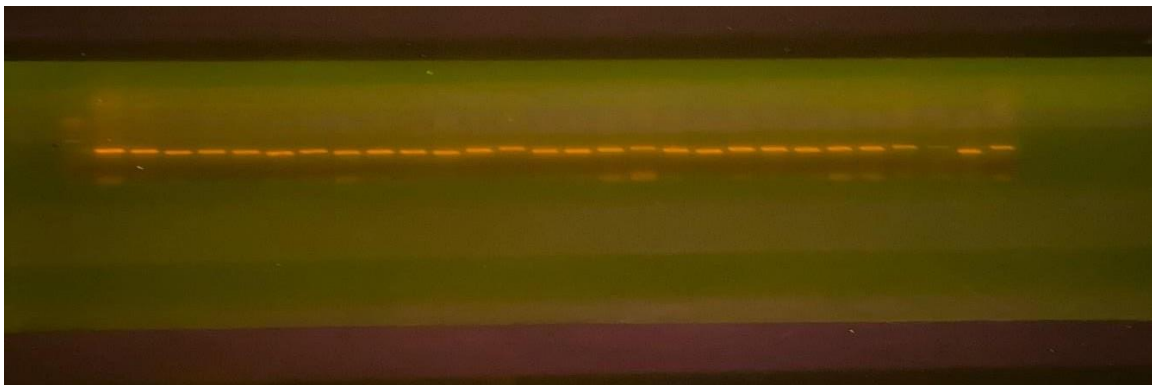


Figura 2. Gel de agarose evidenciando a qualidade do material obtido em PCR.

Dessa mesma forma, foi feito também com os grupos 2 e 3. Os amplicons que não obtiveram uma qualidade desejada, foram sendo separados para formação de um novo grupo, os quais passaram pela realização de uma nova extração e de um novo PCR com modificação nos *primers*, utilizando *primers* F1 e R7.

Ainda assim alguns amplicons não estavam com a qualidade desejada, então foram feitas algumas modificações no protocolo para um novo teste. O novo PCR foi feito na temperatura e tempo do termociclador, seguindo os moldes da **tabela 3**.

Tabela 3: Descrição do ciclo de amplificação utilizada para amplificação do DNA para amplicons separados:

Etapas	Temperatura	Tempo
1	94°C - Desnaturação inicial	4 minutos
	94°C — Desnaturação cadeia	30 segundos
2 — Esse passo foi repetido 30X	52°C — hibridização primers	30 segundos
	68°C — Extensão nucleotídeos	1 minuto
3	68°C - Extensão final	10 minutos
	12°C	∞

Alguns amplicons permaneceram com qualidade baixa, porém foi decidido mantê-los no experimento e dar continuidade para a próxima etapa.

3.2.2. Posterior à realização do PCR com gene COI, utilizamos o marcador de região controle D-loop para investigar a existência de uma possível diferenciação populacional. Assim, obtivemos 40 sequências, utilizando os *primers* F4 862932 e R4 862932 – D-LOOP, as quais foram avaliadas e nas quais foram encontradas inserções que apontavam para possíveis mutações que foram avaliadas mais claramente nas análises.

3.3. EXOSAP

O Exosap foi realizado com intuito de eliminar as nucleases (restos de enzimas) presentes gerando uma pureza maior, afim de não influenciar na qualidade do sequenciamento.

3.4. SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento inicialmente foi realizado em duas etapas: Reação de sequenciamento e limpeza. Posteriormente, submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger *et al.* (1977) em um sequenciador ABI3500 da Applied Biosystems disponível no Instituto de Biotecnologia da UNESP, campus de Botucatu.

4. Resultados das análises

4.1 COI

Um total de 92 sequências foram obtidas. Ao final das análises do estudo, somente 44 sequências (**Tabela 4**) de DNA barcoding foram consideradas tendo em vista a repetição de muitos haplótipos. Nas análises não foram encontradas inserções, deleções ou stop-codons, mostrando que todas as regiões amplificadas correspondem a sequências funcionais do gene mitocondrial COI.

Tabela 4. Espécimes utilizados para análises de sequências.

LBPV	Espécie	Município/Estado
90409	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Vitória/ES
90410	<i>C. chrysurus</i>	Vitória/ES
82515	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
90407	<i>C. chrysurus</i>	Vitória/ES

97853	<i>C. chrysurus</i>	João Pessoa/PB
94982	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
90225	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
94634	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
91885	<i>C. chrysurus</i>	Torres/RS
80146	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
84326	<i>C. chrysurus</i>	Maceió/AL
94627	<i>C. chrysurus</i>	Pará
82512	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
90408	<i>C. chrysurus</i>	Vitória/ES
88372	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
82513	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
90074	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
85650	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
94983	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
80145	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
73253	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC
89522	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
94697	<i>C. chrysurus</i>	Pará
90589	<i>C. chrysurus</i>	Anchieta/ES
89524	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
80147	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
80137	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
80138	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
94628	<i>C. chrysurus</i>	Pará
90224	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
90406	<i>C. chrysurus</i>	Vitória/ES
80135	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
82514	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
80136	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
85870	<i>C. chrysurus</i>	Acaraú/CE
84397	<i>C. chrysurus</i>	Paripueira/AL

85871	<i>C. chrysurus</i>	Acaraú/CE
85649	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
80139	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
91984	<i>C. chrysurus</i>	Torres/RS
73321	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC
97854	<i>C. chrysurus</i>	João Pessoa/PB
73256	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC
86333	<i>C. chrysurus</i>	Bragança/PA

4.1.1 Identificação molecular *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766)

As 44 sequências de *Chloroscombrus chrysurus* obtidas apresentaram fragmentos que variaram de 452a 598 pb antes da limpeza final. Adicionalmente 30 sequências foram extraídas do BOLD (**Tabela 5**) e adicionadas aos conjunto de dados. Uma sequência de *Sphoeroides testudineus* foi utilizada como grupo externo em nossas análises. No total, 75 sequências compuseram as análises e a construção do dendrograma em nosso estudo (**Figura 3**).



Figura 3. Árvore de Neighbour-Joining (NJ) de *Chloroscombrus chrysurus* construída com o modelo de substituição Kimura-2-parametros (K2P) mostrando as relações entre as amostras disponíveis no BOLD e as sequências LBPV são do presente estudo. Os números inseridos nos ramos são os valores correspondentes aos *bootstraps*.

Tabela 5. Sequências extraída do BOLD.

ID	BIN	Espécie	Pais	Estado
ANGBF17304-19	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>		
ANGBF17305-19	BOLD:AEU81 47	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Brasil	
ANGBF17306-19	BOLD:AEU81 47	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Brasil	
ANGBF17307-19	BOLD:AEU81 47	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Brasil	
ANGBF17308-19	BOLD:AEU81 47	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Brasil	
ANGBF17309-19	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Brasil	
BZLWE434-08	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Belize	
CFSAN111-11	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Alabama
FBW033-14	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Guatemala	Izabal
FBW034-14	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Guatemala	Izabal
FBW035-14	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Guatemala	Izabal
FBW036-14	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Guatemala	Izabal
FBW037-14	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Guatemala	Izabal
FCCA040-09	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Florida
FCCA041-09	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Florida
FCCA042-09	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Florida
FCCA043-09	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Florida
FCCA044-09	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	Florida
FJMI002-10	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	México	Quintana Roo
FJMI003-10	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	México	Quintana Roo
FJMI004-10	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	México	Quintana Roo
GBMND24287-21	BOLD:AEU81 46	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Nigeria	
GBMNF44121-22	BOLD:AAD51 27	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	Estados Unidos	
MFLE678-16	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	México	Quintana Roo

	27	<i>chrysurus</i>		
MFLV570-10	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	Belize	
	27	<i>chrysurus</i>		
MXIV286-10	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	México	Campeche
	27	<i>chrysurus</i>		
MXIV418-10	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	México	Campeche
	27	<i>chrysurus</i>		
MXV800-15	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	México	Campeche
	27	<i>chrysurus</i>		
MXV801-15	BOLD:AAD51	<i>Chloroscombrus</i>	México	Campeche
	27	<i>chrysurus</i>		

A árvore de Neighbour-Joining (NJ) (Figura 4) mostrou que os exemplares em todo o litoral da costa do Brasil alocaram em um único clado. Posteriormente, através do software MEGA7, foram obtidas as distâncias genéticas, utilizando o modelo K2P e valor de bootstrap de 1000 repetições, para poder confirmar a veracidade dos resultados mostrados na árvore.

A análise dos conjuntos de dados utilizando do gene COI resultou uma distância genética intraespecífica de 0,0029. Estes resultados mostram que a espécie em estudo pertence a uma única linhagem, distribuída no Oceano Atlântico Ocidental.

4.2 Morfometria da espécie *Chloroscombrus chrysurus*

Foi feita uma análise morfométricas de exemplares de *C. chrysurus* da costa do Brasil pelo Dr. Alexandre P. Marceniuk que sugeriu que existem dois grupos para costa do Brasil (Gráfico 1), com diferença no número de rastros branquiais.

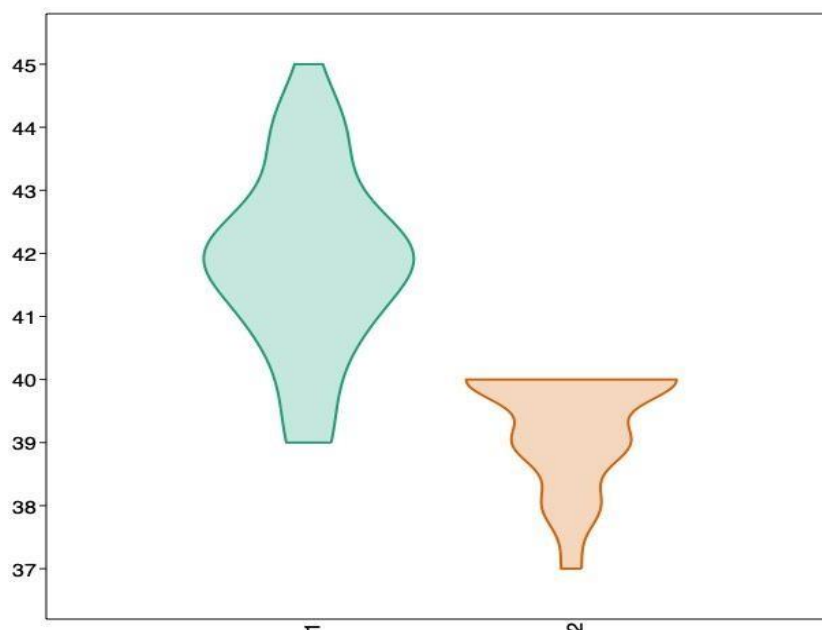


Gráfico 1. Gráfico boxplot em formato violono ilustrando a contagem de rastos brânquias da espécie *Chloroscombrus chrysurus*. Legenda: 1. Espécime da costa Norte; 2. Espécime da costa do Sudeste do Brasil.

4.3 D-LOOP

Para esse marcador mitocondrial foi obtido 44 sequências. Ao final das análises do estudo, 40 sequências (**Tabela 6**) com 900 - 1000 pares de base foram consideradas. Adicionalmente outra sequência extraída do BOLD de *C. chrysurus* da região D_LOOP foram utilizada em nossas análises.

Tabela 6. Espécimes utilizados para análises de sequências D-LOOP.

LBPV	Espécie	Município/Estado
90410	<i>C. chrysurus</i>	Vitória/ES
82515	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
97853	<i>C. chrysurus</i>	João Pessoa/PB
94982	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
90225	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
94634	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA

91885	<i>C. chrysurus</i>	Torres/RS
80146	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
84326	<i>C. chrysurus</i>	Maceió/AL
94627	<i>C. chrysurus</i>	Pará
82512	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
88372	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
82513	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
90074	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
85650	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
94983	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
80145	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
73253	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC
89522	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
94697	<i>C. chrysurus</i>	Pará
90589	<i>C. chrysurus</i>	Anchieta/ES
89524	<i>C. chrysurus</i>	Belém/PA
80147	<i>C. chrysurus</i>	São Sebastião/SP
80137	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
80138	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
90224	<i>C. chrysurus</i>	Valença/BA
80135	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
82514	<i>C. chrysurus</i>	Rio de Janeiro/RJ
80136	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
85870	<i>C. chrysurus</i>	Acaraú/CE
84397	<i>C. chrysurus</i>	Paripueira/AL
85871	<i>C. chrysurus</i>	Acaraú/CE
85649	<i>C. chrysurus</i>	Amapá
80139	<i>C. chrysurus</i>	Fortaleza/CE
91984	<i>C. chrysurus</i>	Torres/RS
73321	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC
97854	<i>C. chrysurus</i>	João Pessoa/PB
73256	<i>C. chrysurus</i>	Balneário Camboriú/SC

86333	<i>C. chrysurus</i>	Bragança/PA
-------	---------------------	-------------

No total, 41 sequências compuseram as análises e para a construção do dendrograma em nosso estudo (**Figura 4**).

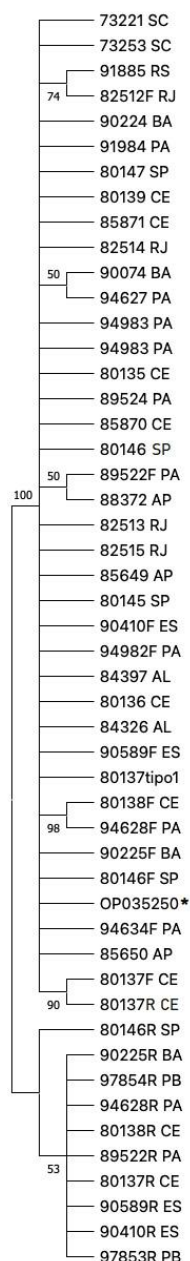


Figura 4. A árvore Neighbour-Joining (NJ) da espécie *Chloroscombrus chrysurus* utilizando o modelo de substituição Kimura-2-parametros (K2P), ilustrando as relações entre as sequências do presente estudo. Os números inseridos nos ramos são os valores correspondentes aos *bootstraps*. * Sequência oriunda do Genbank.

A árvore Neighbour-Joining (NJ) (Figura 4) mostrou que os exemplares em todo o litoral da costa do Brasil alocaram em dois clados diferentes, e com base na observação das sequências obtidas, é possível notar que algumas dessas sequências se repetiram em ambos os clados (sequências sinalizadas com R e/ou F), sendo assim, um resultado diferente do observado com o marcador COI. Posteriormente, através do software MEGA7, foram obtidas as distâncias genéticas, utilizando o modelo K2P e valor de *bootstrap* de 1000 repetições, para poder confirmar a veracidade do resultado avaliado pela árvore. A análise dos conjuntos de dados utilizando a região controle D-loop resultou uma distância genética intraespecífica de 0,390.

5. Discussão

Entre as vantagens que tornam o DNAmT uma ferramenta poderosa para estudos evolutivos pode-se citar: elevado número de cópias por célula; alta taxa evolutiva, maior do que genes codificadores de proteínas do genoma nuclear; ausência de recombinação e modo de herança materna (Brown, 1980). Vários estudos baseados no sequenciamento do DNAmT vêm sendo realizados com peixes. Grande parte desses trabalhos caracteriza a variabilidade genética ao longo da distribuição geográfica de uma espécie e revelam a existência ou não de estrutura populacional (Porto, 1999).

5.1 COI

Os resultados obtidos foram primeiramente utilizados com o objetivo do DNA barcoding proposto por Hebert et al. (2003). O código de barras provou ser uma abordagem confiável para documentar a biodiversidade, por ser um sistema global para a identificação de animais como observado na espécie em estudo *Chloroscombrus chrysurus*. A ferramenta de identificação molecular utiliza um marcador genético, um fragmento parcial do gene COI do DNA mitocondrial com aproximadamente 650 pb com alta taxa mutacional (Saccone, 1999).

A eficácia do DNA barcoding para discriminação das espécies pode ser levada em consideração também pelo fato de que a evolução do genoma mitocondrial seria influenciada pelos meios de seleção e o efeito resultaria uma seleção favorecendo algumas regiões desse gene, ao invés de simplesmente ser influenciada pela deriva genética e taxas evolutivas constantes, de maneira que o COI não seria *a priori*, um marcador estritamente neutro (Ballard & Whitlock, 2004).

Inicialmente a hipótese do presente estudo seria que *C. chrysurus* poderia ser um complexo de espécie, ao decorrer do estudo, foi observado diferenças morfológicas (rastros branquiais) em espécimes do Norte, Nordeste em relação ao Sudeste e Sul da costa do Brasil (Alexandre. P. Marceniuk, comunicação pessoal), sugerindo a ocorrência de duas linhagens. Entretanto, os resultados genéticos, utilizando o gene COI, permitiram a identificação de apenas uma linhagem.

A hipótese sugere que a divergência dessas espécies é muito recente para ser totalmente resolvida pelos dados do DNA barcode. Ainda que a distância genética empregando DNA barcoding é um forte indicador de linhagens ou espécies (Ward et al. 2005), estes valores de distância foram derivados de análises comparativas entre grupos filogeneticamente diversos, enquanto análises de DNA barcoding de grupos de espécies intimamente relacionados podem resultar em valores mais baixos (Pereira et al. 2013).

Uma segunda hipótese em discussão, seria a capacidade da espécie *C. chrysurus* em transpor algumas barreiras através da dispersão larval pelágica de estágios larvais e juvenis (Rocha et al., 2005). Além disso, padrões de circulação oceânica, regime de temperatura, topografia costeira, requisitos ambientais e história de vida das espécies estão entre os principais fatores explicativos para dispersão.

Alguns trabalhos a cerca da espécie, como os citados por Accioly (2007), dizem que *Choroscombrus chrysurus* possui cariótipo com 48 cromossomos, sendo todos acrocêntricos, como a maioria das espécies da família Carangidae com cariótipo conhecido (Accioly, 2007). Os resultados citogenéticos para a espécie *C. chrysurus* obtidos no estudo citado, não identificam diferenciações quanto ao cariótipo para amostras desta espécie coletadas no litoral do Sudeste Brasil. A comparação do (Nordeste do Brasil) com (Sul e Sudeste do Brasil), para esta espécie, demonstra que mesmo largas distâncias geográficas não apresentaram diferenças cariotípicas significativas da espécie (Accioly, 2007).

5.2 D-LOOP

O DNAmt é uma ferramenta poderosa para estudos evolutivos. O marcador de região controle D-loop origina-se pelo início da replicação realizada por deslocamento de uma fita em relação à outra, formando uma alça, denominada D-loop, esta região também foi utilizado para investigar melhor a espécie em questão. Em peixes, a região controle apresenta cerca de 1.100 pares de bases (pb) um domínio conservado central e duas porções ricas em A/T (extremamente variáveis) nas extremidades. Esse marcador é

responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o DNAm (Meyer, 1993).

Inicialmente a hipótese do presente estudo era que *C. chrysurus* poderia ser um complexo de espécies, mas os resultados genéticos, utilizando o gene COI identificaram apenas uma linhagem. Entretanto, considerando a diferença morfológica observada, passamos a cogitar a hipótese de que a divergência dessas espécies poderia ser muito recente para ser resolvida pelos dados do gene COI. Sendo assim, foi necessário complementar os dados aqui obtidos com o uso do marcador D-LOOP, que apresenta uma taxa de evolução mais rápida que o COI.

Ao compilar os resultados das análises da espécie *C. chrysurus* observamos, por meio do marcador D-LOOP, uma distância intraespecífica maior e que os ramos da árvore de Neighbour-Joining (NJ) compõe dois grupos. Entretanto, analisando diversos exemplares vimos que eles apresentavam duas linhagens mitocondriais que, quando analisadas separadamente se posicionavam em ramos distintos da árvore. A heteroplasmia mitocondrial é um estado onde um mesmo indivíduo apresenta moléculas de mtDNA variantes (Lightowers et al., 1997). A heteroplasmia pode ser de comprimento, quando as moléculas apresentam tamanhos distintos, ou pontual, na qual as diferenças ocorrem devido a substituições nucleotídicas (Vollmer et al., 2011).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que *C. chrysurus* possui heteroplasmia que pode ser por uma característica populacional ou derivada de hibridação. A heteroplasmia tem sido descrita em peixes marinhos e há evidências de ocorrência em zonas de hibridização (Dowling; Secor, 1997; Willis et al., 2012; Mirimin et al., 2014). Desse modo, a hibridação natural é considerada um fenômeno importante para a evolução dos organismos, pela possibilidade de surgimento de genótipos que poderiam estabelecer novas linhagens evolutivas (Arnold; Hodges, 1995).

Os espécimes da espécie *C. chrysurus* apresentam mecanismos de isolamento, possivelmente devido a sua biologia, que consiste em habitar águas litorâneas, preferencialmente baías e regiões estuarinas quando jovens (Costa et al., 2005) sobre fundos arenosos e argilosos da plataforma continental quando mais adultos (Cunha et al., 2000), fato esse que pode torná-los potencialmente suscetíveis à hibridização. Assim, diante dos dados obtidos, e considerando a ausência de um consenso a nível molecular, podemos sugerir uma origem híbrida para as linhagens observadas.

Entretanto, apenas com a análise do gene D-LOOP ainda é prematuro a confirmação de tal fenômeno. Dessa maneira, mais pesquisas são necessárias para

entender e elencar os mecanismos de hibridização dentro deste grupo e também para determinar suas consequências evolutivas. Isto inclui análises adicionais que integram amostragem mais ampla, em nível taxonômico e geográfico, além da análise de genes nucleares usando o sequenciamento de nova geração (Pazmiño et al. 2019) para compreender e quantificar melhor o grau de introgressão (Harrison & Larson 2014).

6. Referências bibliográficas

- Accioly, I.V. (2007). Levantamento cariotípico em espécies de peixes marinhos costeiros de fundo arenoso (Osteichthyes, Peciformes), Universidade do Rio Grande do Norte.
- Albert, J.S., Petry, P., Reis, R.E. (2011). Major biogeographic and phylogenetic patterns. in: Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes.
- Albert, J.S., Reis, R.E. (Eds.), University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 21-57.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, v. 13, n. 4, 729-744.
- Arnold, M.; Hodges, S. (1995). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 10, n. 2, p. 67–71.
- Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonucleases analysis. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 77: 3605-3609p.
- BROWN, Terry. (2008). Genomas/Genome. Ed. Médica Panamericana.
- Bucking R, Cox MP, Hudjashov G, Saag L, Sudoyo H, Stoneking M (2019). Inserções arcaicas de DNA mitocondrial nos genomas nucleares modernos. *Genômica BMC* 20(1):1017.
- Carvalho, D.C., et al. (2009). Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 601–607.
- Costa M.R., Albieri R.J., Araújo F.G. (2005). Size distribution of the jack *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus) (Actinopterygii, Carangidae) in a tropical bay at Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Zool*, 22 (3).
- Cunha F.E.A., Freitas J.E.P., Feitosa C.V., Monteiro N.C. (1980). Biologia e biometria da palombeta, *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766). *Arquivos de Ciência do Mar*, Ceará.
- Dowling, T.; Secor, C. (1997) The role of hybridization and introgression in the

- diversification of animals. *Annual review of Ecology and Systematics*, v. 28, p. 593–619.
- Harrison, R.G. & Larson, E.L. (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105, 795–809.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., Dewaard, J.R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 270 (Suppl.), S96-S99.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
- Lightowlers, R.N.; Chinnery, P. F.; Turnbull, D. M.; Howell, N. *Mammalian*. (1997). Mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics*, v. 13, n. 11, p. 450-455.
- Marceniuk, A. P., et al. (2020) Taxonomic revision of the *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) and *M. littoralis* (Holbrook, 1847) (Percomorphacea: Sciaenidae) species complexes from the western Atlantic. *Zootaxa* 4822(3), 301-333.
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA In fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2:1-38.
- Mirimin, L.; Kerwath, S. E.; Macey, B. M.; et al. (2014). Identification of naturally occurring hybrids between two overexploited sciaenid species along the South African coast. *Molecular phylogenetics and Evolution*, v. 76, p. 30–3.
- Mora, C., Tittensor, DP. & Myers, RA (2008) A integridade dos inventários taxonômicos para descrever a diversidade global e distribuição de peixes marinhos. *Proceedings of the Royal Society*, 275, 149-155.
- Nobile, A. B., Freitas-Souza, D., Ruiz-Ruano, F.J., Nobile, M.L.N.O., Costa, G.O., Lima, F.P., Camacho, J. P. M., Foresti, F. & Oliveira, C. (2019) DNA metabarcoding of Neotropical ichthyoplankton: Enabling high accuracy with lower cost. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, 69–76.
- Pazmiño, D.A., van Herderden, L., Simpfendorfer, C.A., Junge, C., Donnellan, S.C., Hoyos-Padilla, E.M., Duffy, C.A.J., Huveneers, C., Gillanders, B.M., Butcher, P.A. & Maes, G.E. (2019) Introgressive hybridisation between two widespread sharks in the east Pacific region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 119–127.

- Pereira, L.H., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. (2013). Can DNA Barcoding Accurately Discriminate Megadiverse Neotropical Freshwater Fish Fauna? *BMC Genet*, 14, 20.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364.
- Rocha, L. A., Robertson, R.D., Roman, J., Bowen, B.W. (2005). Ecological speciation in tropical reef fishes. The Royal Society.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209.
- Trivedi, S., Aloufi A. A., Rehman, H., Saggu, S., Ghosh S. K., (2016), DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia, *Journal of Entomology and Zoology Studies*.
- Vollmer, N. L.; Viricel, A.; Wilcox, L; Moore, K. M.; Rosel, P. E. (2011). The occurrence of mtDNA heteroplasmy in multiple cetacean species. *Current Genetics*, v. 57, n.2, p. 115-131.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D. (2005). DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 1847– 1857.
- Willis, S. C. et al. (2012). Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 1, p. 96.