

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Variabilidade genética de bagres marinhos dos gêneros *Cathorops* e *Genidens* (Siluriformes: Ariidae) no oceano Atlântico Ocidental

Najila Nolie Catarine Dantas Cerqueira

Botucatu - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Variabilidade genética de bagres marinhos dos gêneros *Cathorops* e *Genidens* (Siluriformes: Ariidae) no oceano Atlântico Ocidental

Aluna: Najila Nolie Catarine Dantas Cerqueira

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Coorientador: Dr. Alexandre Pires Marцениuk e
Dra. Vanessa Paes da Cruz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para a obtenção do título de Doutor.

Botucatu - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cerqueira, Najila Nolie Catarine Dantas.

Variabilidade genética de bagres marinhos dos gêneros
Cathorops e *Genidens* (Siluriformes: Ariidae) no oceano
Atlântico Ocidental / Najila Nolie Catarine Dantas
Cerqueira. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudio Oliveira
Coorientador: Alexandre Pires Marceniuk
Coorientador: Vanessa Paes da Cruz
Capes: 20204000

1. Bagre (Peixe) - População. 2. Peixe - Genética.
3. Genômica. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único.

Palavras-chave: Bagres marinhos; Genômica populacional;
SNPs; ddRad.

“O medo é uma emoção. A Fé é uma atitude e uma escolha.”

Mark Finley

Dedico este estudo a todos os cientistas e apreciadores de peixes.

AGRADECIMENTOS

Quão gratificante foi chegar até aqui, mais claro, nunca concluiria esta interessante pesquisa sozinha, pois primeiramente agradeço a Deus por ter sido meu Tudo e Meu baluarte quando as muitas análises realizadas até aqui não davam muito certo, foi em Deus que obtive paz, fé e sabedoria.

Agradeço a minha família, meu esposo Júlio que sempre se mostrou tão parceiro e amoroso em todas as etapas conquistadas, a minha mamãe poderosa Acácia que mesmo longe não media esforços para estar sempre presente em meio de orações, palavras inspiradoras e muito amor, e a todos da minha família em Porto Velho (RO) que sempre apoiaram e vibraram pela obtenção deste título tão sonhado.

Agradeço ao meu orientador Dr. Claudio Oliveira por ser um homem tão brilhante e gentil, por sempre estar disposto discutir e encontrar soluções para as muitas perguntas nestes anos de orientação, minha eterna gratidão por sua confiança. Também tive ao meu lado excelente coorientadores, agradeço ao Dr. Alexandre P. Marceniuk pelo seu vasto conhecimento taxonômico e sua paciência ao me ensinar, e claro as muitas coletas realizadas, a Dra Vanessa P. da Cruz por mostrar que podemos realizar tudo aquilo que almejamos, basta acreditar que dará certo, a sua resiliência em ensinar e não medir esforços e criatividade para que eu pudesse entender e realizar da melhor forma tudo aquilo que havia estudado e realizado, muito obrigada.

Ao professor Dr. Fausto Foresti que sempre esteve conosco nos auxiliando com suas ideias e opiniões geniais que só ele consegue ver e nos permitir abrir a mente, pelos doces momentos juntos ao café e as boas risadas vividas, muito obrigada professor ser um homem tão especial.

Ao Me. Matheus M. Rotundo pela imprescindível colaboração nas coletas, identificação dos espécimes e as belas imagens, obrigada. Não poderia deixar de agradecer aos pescadores envolvidos nas coletas e as demais colaborações a Dr. Camila Mazzoni (BEGNDIV) por nos apresentar ao mundo da bioinformática.

As agências de fomento FAPESP, CNPq e Capes. A coordenação de Pós Graduação em Genética do Instituto de Biociências (IBB) da Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho” de Botucatu – Unesp.

As minhas amigas que me adotaram e me amam do meu jeitinho, muito obrigada amigas: Jojo, Fabi, Van, Bia, May, Gi, Gabi pelos conselhos, risadas e por muitos momentos

de amadurecimento, muito obrigada meninas pela sincera amizade, e a todos os colegas do laboratório pelo harmonioso ambiente trabalho que temos que nos dá sempre vontade de estar.

Gratidão!

APOIO FINANCEIRO



Número do processo
142561/2018-5



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA
DO ESTADO DE SÃO PAULO

Número do processo
18/20610-1

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



Resumo

Os bagres marinhos dos gêneros *Cathorops* e *Genidens*, apresentam uma história evolutiva recente resultando em plasticidade fenotípica, refletida em uma taxonomia complexa. Diante dessa complexidade, o objetivo deste estudo foi avaliar a divergência, diversidade e estruturação genética desses gêneros ao longo da costa do Brasil, e testar a hipótese de que as barreiras ecológicas e marinhas podem estar influenciando nas características biológicas das espécies do presente estudo. No gênero *Cathorops* quatro espécies foram identificadas morfologicamente *Cathorops arenatus*, *Cathorops spixii*, *Cathorops agassizii*, e *Cathorops* sp. para 68 indivíduos, enquanto que as análises com mtDNA (*CytB* e *ATPase 6/8*) identificaram as espécies *C. agassizii/C. spixii* e *C. arenatus/Cathorops* sp. Um total de 5.578 SNPs para as espécies do gênero *Cathorops* foram obtidos, através da metodologia ddRAD, os resultados da RaxML e das análises de divergência genética (F_{ST} , STRUCTURE e DAPC) indicaram a ocorrência das espécies *C. agassizii* (n=22), *C. arenatus* (n=14) e *Cathorops* sp. (n=32) para a costa do Brasil. A diversidade genética das espécies *C. arenatus*, *C. agassizii* e *Cathorops* sp. com base nos valores da heterozigosidade (H_O/H_E) e F_{IS} indicaram excesso de homozigotos e endogamia, sugerindo baixa diversidade genética para as três espécies. Os resultados populacionais da espécie *C. agassizii* da costa do Brasil, indicaram ausência de estruturação populacional ($F_{ST} > 0,025$). Em contrapartida, na espécie *Cathorops* sp. foi detectada uma estruturação genética ($F_{ST} = 0,070$) entre a costa Nordeste e Sudeste. O STRUCTURE resultou em um K=3, um *cluster* com amostras do Ceará, o segundo *cluster* na Bahia e Espírito Santo e o terceiro *cluster* para os indivíduos de Sergipe, Rio de Janeiro e São Paulo. Quando avaliados os valores de F_{ST} entre os *clusters* ($F_{ST} > 0,108$) indicaram também uma estruturação populacional. No gênero *Genidens* 51 indivíduos foram amostrados da costa Sudeste ao Sul do Brasil, com três espécies identificadas morfologicamente como *Genidens barbatus* (n=18), *Genidens genidens* (n=27) e *Genidens machadoi* (n=06). A análise de identificação molecular com o uso de mtDNA sugeriu a existência de apenas uma espécie. Todavia, a divergência genética utilizando 1.099 SNPs permitiu identificar uma divergência genética entre as espécies *G. barbatus* e *G. genidens* ($F_{ST} 0,415$, STRUCTURE e DAPC). A comparação entre as espécies *G. machadoi* e *G. barbatus* resultou num valor moderado de $F_{ST} = 0,052$. Esses dados mostram que há uma diferenciação genética entre *G. barbatus* e *G. genidens*, e uma baixa diferenciação genética entre as espécies *G. machadoi* e *G. barbatus*. Os resultados de diversidade genética para a espécie *G. barbatus* e *G. genidens* dos valores da heterozigosidade (H_O/H_E) indicaram excesso de heterozigotos, mesmo tendo sido verificado um valor de F_{IS} positivo, sugerindo presença de

diversidade genética para as espécies do gênero *Genidens*. Os indivíduos da *G. barbatus* amostrados na costa Sudeste e Sul do Brasil não apresentaram estruturação genética ($F_{ST} = 0,031$). Contudo, quando avaliado o valor de F_{ST} com base nos *clusters* detectados no STRUCTURE ($K=2$), foi identificado um $F_{ST} = 0,330$, resultando na estruturação genética entre exemplares de *G. barbatus* e três indivíduos do Rio Grande do Sul. As hipóteses para compreender os resultados obtidos neste estudo, indicam que a ausência de estruturação populacional em *C. agassizii*, pode ser devida ao fato das espécies se adaptarem a ambientes estuarinos heterogêneos. Em relação a espécie *Cathorops* sp. a presença de estruturação genética observada entre as populações, pode estar associada a distância geográfica de amostragem, e as variações do nível do mar, que poderiam influenciar a dispersão destas populações. Enquanto que no gênero *Genidens*, a ausência de estruturação pode estar relacionada à capacidade das espécies migrarem para diferentes porções estuarinas no período de reprodução, e as conectividade das populações através dos ciclos pluviais, não ocorrendo influência de possíveis barreiras biogeográficas (temperatura, salinidade e sedimentos). Assim, apesar da complexidade taxonômica dos bagres marinhos dos gêneros *Cathorops* e *Genidens*, que apresentam grande plasticidade fenotípica, foi possível identificar as espécies que estão distribuídas na Costa do Brasil, e entender como, as barreiras biogeográficas estão influenciando os indivíduos das espécies do gênero *Cathorops* e *Genidens* a uma estruturação populacional.

Abstract

Marine catfishes of the genera *Cathorops* and *Genidens* have a recent evolutionary history resulting in phenotypic plasticity, reflected in a complex taxonomy. Given this complexity, the objective of this study was to evaluate the divergence, diversity and genetic structure of these genera along the coast of Brazil, and to test the hypothesis that ecological and marine barriers may be influencing the biological characteristics of the species. In the genus *Cathorops*, four species were morphologically identified *Cathorops arenatus*, *Cathorops spixii*, *Cathorops agassizii* and *Cathorops* sp. for 68 individuals, while mtDNA analyzes (CytB and ATPase 6/8) identified only one species: *C. agassizii*. A total of 5.578 SNPs for the species of the genus *Cathorops* were obtained, through the ddRAD methodology, the results of RaxML and genetic divergence analyzes (F_{ST} , STRUCTURE and DAPC) indicated the occurrence of the species *C. agassizii* (n=22), *C. arenatus* (n=14) and *Cathorops* sp. (n=32) in Brazilian coast. The genetic diversity of *C. arenatus*, *C. agassizii* and *Cathorops* sp. based on heterozygosity values (H_O/H_E) and F_{IS} indicated excess of homozygotes and inbreeding, suggesting low genetic diversity for the three species. The population results for the species *C. agassizii* from the coast of Brazil indicated the absence of population structure ($F_{ST} > 0.025$). On the other hand, in *Cathorops* sp. a genetic structure was detected ($F_{ST} = 0.070$) between the Southeast and South coasts. STRUCTURE resulted in K=3, the first cluster with samples from Ceará, the second cluster in Bahia and Espírito Santo and the third cluster for individuals from Sergipe, Rio de Janeiro de Janeiro and São Paulo. When the F_{ST} values between the clusters ($F_{ST} > 0.108$) were evaluated, they also indicated a population structure. In the genus *Genidens* 51 individuals were sampled from the Northeast coast to the South of Brazil, with three species morphologically identified as *Genidens barbatus* (n=18), *Genidens genidens* (n=27) and *Genidens machadoi* (n=06). Molecular identification analyzes using mtDNA suggested the existence of only one species. However, the genetic divergence using 1.099 SNPs allowed to identify a genetic divergence between the species *G. barbatus* and *G. genidens* (F_{ST} 0.415, STRUCTURE and DAPC). The comparison between the species *G. machadoi* and *G. barbatus* resulted in a moderate value of $F_{ST} = 0.052$. These data show that there is a genetic differentiation between *G. barbatus* and *G. genidens*, and a low genetic differentiation between the species *G. machadoi* and *G. barbatus*. The results of genetic diversity for the species *G. barbatus* and *G. genidens* of the heterozygosity values (H_O/H_E) indicated excess of heterozygotes, even though a positive F_{IS} value was verified, suggesting the presence of genetic diversity for the species of the genus *Genidens*. The individuals of *G. barbatus* sampled in the Southeast and South coast of Brazil did not present

genetic structure ($F_{ST} = 0.031$). However, when evaluating the F_{ST} value based on the clusters detected in the STRUCTURE (K=2), an $F_{ST} = 0.330$, was identified, resulting in the genetic structure between specimens of *G. barbatus* and three individuals from Rio Grande do Sul. The hypotheses to understand the results obtained in this study indicate that the absence of a population structure in *C. agassizii* may be due to the fact that the species adapts to heterogeneous environments in estuaries. In relation to *Cathorops* sp. the presence of genetic structuring observed among populations may be associated with geographic sampling distance, and sea level variations, which could influence the dispersion of these populations. While in the genus *Genidens* the lack of structure may be related to the ability of the species to migrate to different estuarine portions during the reproduction period, with population connectivity through rainfall cycles, without the influence of possible biogeographic barriers (temperature, salinity and sediments). Thus, despite the taxonomic complexity of marine catfish of the genera *Cathorops* and *Genidens*, that present great phenotypic plasticity, it was possible to identify the species that are distributed along the Brazilian coast, and understand how the biogeographic barriers are influencing the individuals of the species of the genus *Cathorops* and *Genidens* to a population structure.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivos específicos	23
3.	MATERIAL	24
4.	MÉTODOS	25
4.1	DNA <i>mitochondrial</i>	25
4.1.1	Extração do DNA	25
4.1.2	Reação de PCR e Sequenciamento.....	25
4.1.3	Edição e alinhamento das Sequências	26
4.2	SNPs.....	27
4.2.1	Extração de DNA	27
4.2.2	Construção da biblioteca <i>ddRAD</i> para SNPs.....	27
4.2.3	Digestão enzimática	27
4.2.4	Ligação de adaptadores	28
4.2.5	Indexação	28
4.2.6	Construção do <i>Pool</i> e <i>Size selection</i>	29
4.2.7	Análise de Bioinformática.....	29
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	Capítulo 1-Evidências de diversidade genética e estruturação populacional no complexo taxonômico das espécies ao gênero <i>Cathorops</i> na costa do Brasil.	33
5.	RESULTADOS.....	34
5.1	<i>Identificação molecular – marcadores mitocondriais</i>	34
5.2	SNPs.....	37
5.2.1	Filogenômica.....	37
5.2.2	Genômica Populacional.....	38
6.	DISCUSSÃO.....	44
	<i>Identificação das espécies do gênero Cathorops</i>	44
	<i>Estruturação genética nas populações de Cathorops agassizii e Cathorops sp.</i>	46
	Capítulo 2 - Genômica populacional do gênero <i>Genidens</i> (Ariidae) para a costa Sudeste e Sul do Brasil	49
7.	RESULTADOS	50
7.1	<i>Identificação molecular</i>	50
7.2	SNPs.....	52
7.2.1	Genômica populacional.....	52
8.	DISCUSSÃO.....	57

<i>Identificação molecular das espécies do gênero Genidens</i>	57
<i>Diversidade Genética e estruturação populacional nas espécies do gênero Genidens</i>	58
<i>A sobrepesca em espécies de bagres marinhos do Atlântico Sudoeste</i>	60
9. CONSIDERAÇÕES.....	61
9. REFERÊNCIAS.....	62
10. SUPLEMENTAR.....	80

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes marinhos passaram por eventos glaciais (congelamento e descongelamento), apresentando diferentes padrões de correntes oceânicas, além disso, podendo apresentar barreiras biogeográficas, caracterizadas por condições ecológicas (gradientes de salinidade, pH e temperatura), entre outros, os quais são fatores importantes para a compreensão dos processos evolutivos e as características biológicas das espécies estuarinas e costeiras (Silva et al., 2016; Freitas et al., 2017; Pinheiro et al., 2018; Jeffries et al., 2019). Em uma linha evolutiva, as características das espécies e populações estuarinas e marinhas foram grandemente afetadas pelos ciclos glaciais e interglaciais do Pleistoceno, respectivamente, devido a eventos eustáticos (Brown & Lomolino, 2006) em regiões tropicais e temperadas (Jeffries et al., 2019; Thomaz & Knowles, 2020; Buckely et al., 2020).

Os eventos de regressão e transgressão, no decorrer dos ciclos de glaciação, podem ter resultado em variações do nível do mar, temperatura e salinidade, bem como mudanças nos padrões das correntes oceânicas, impulsionando espécies de peixes estuarinos e costeiros a procura por novos habitats podendo influenciar a especiação e dispersão destas espécies. Além disso, os habitats de espécies costeiras os quais foram fragmentados na plataforma continental da América do Sul (Sprechmann, 1978), refletem na demografia histórica de espécies estuarinas e marinhas costeiras, resultando no alto ou baixo número sucessivos de populações, relacionadas a flutuações no clima (Fernández-Iriarte et al., 2011; Baggio et al., 2017).

Alguns estudos com peixes estuarinos e marinhos ao longo da costa do Atlântico demonstram expansões populacionais com padrões filogeográficos, provavelmente resultante de tais flutuações (Da Silva et al., 2018; Thomaz & Knowles, 2020; Pio & Carvalho, 2021). Inclusive, algumas espécies podem não apresentar alta divergência genética pós períodos glaciais como visto em espécies do gênero *Macrodon* (Aderne et al., 2022). Sendo assim, é importante compreender os padrões de variações genéticas, intra e interpopulacionais para identificar a diversidade e estruturação destas espécies pós períodos glaciais.

Os estuários podem ser definidos como corpos d'água que ocupam a região de transição entre os oceanos e os rios, sendo um ambiente costeiro semi-fechado com ligação livre com o oceano aberto (Schaeffer-Novelli et al., 2001). Os estuários representam atividades vitais no ciclo de vida de várias espécies de ictiofauna, no caso de espécies sedentárias; regiões de passagem para espécies anádromas e diádromas, áreas de migração sazonal relacionada aos hábitos alimentares e ainda, regiões para reprodução de espécies marinhas e de água doce

(Vendel & Chaves, 2001; Santos, 2001; Able, 2005), tornado - o um dos ambientes importantes para a manutenção da pesca mundial (Blaber, 2000).

A distribuição de peixes estuarinos e a migração de juvenis para populações adultas estão dentre os fatores ambientais mais suscetíveis a fatores bióticos (por exemplo predação, disponibilidade de alimentos, recrutamento), abióticos (salinidade, oxigênio dissolvido, temperatura) e paisagísticos (tamanho do habitat, conectividade do habitat) (Beck et al., 2003; Barletta et al., 2005; 2008). Vários estudos demonstram que os ambientes estuarinos representam habitats heterogêneos podendo levar ou não a divergências genéticas para algumas espécies de peixes (Silva et al., 2016; Cortinhas et al., 2016; Jeffries et al., 2019; Sebastian et al., 2021).

As populações de peixes estuarinos e costeiros podem representar uma conectividade populacional, influenciada pelos fatores biológicos de comportamento migratório e fatores abióticos, como temperatura, salinidade, sedimentos, e padrões de correntes oceânicas (Freitas et al., 2017; Maciel et al., 2020). Logo a genética populacional é relevante na compreensão da diversidade e estrutura genética de organismos marinhos.

A família Ariidae é de grande relevância ao ambiente estuarino devido à sua alta diversidade, ampla distribuição e abundância (Barletta et al., 2003, 2005; Nelson, 2016). As espécies desta família podem apresentar movimentos sazonais entre ambientes com diferentes salinidades, associadas a diferentes aspectos biológicos, como reprodução, alimentação e ontogenia (Schmidt et al., 2008; Avigliano et al., 2017a).

A família é composta por 34 gêneros com cerca de 155 espécies com distribuição circumglobal (Fricke et al., 2021), exibe uma ampla distribuição geográfica ao longo das costas oceânicas marinhas tropicais e subtropicais (Marceniuk & Menezes, 2007). Habitam águas costeiras migrando para estuários e/ou várzeas costeiras para desova (Rimmer, 1985), tendo os estuários como áreas prioritárias de alimentação, reprodução e abrigo (Schmidt et al., 2008; Silva-Junior et al., 2013; Avigliano et al., 2017a), são espécies demersais com comportamento migratório restrito e cuidado parental (retenção de larvas) (Marceniuk, 2005a).

Na costa brasileira, a família Ariidae está distribuída em oito gêneros e 21 espécies, dentre estes gêneros, o gênero *Cathorops* Jordan & Gilbert, 1883 inclui espécies distribuídas ao longo da costa da América do Sul, da Guiana ao Brasil (Marceniuk, 2005a), caracterizados pela ausência das placas dentais associadas ao vômer e a presença de um par de placas acessórias pequenas e ovaladas, providas de dentes molariformes (Marceniuk & Menezes, 2007).

O gênero *Cathorops* inclui três espécies descritas para a costa do Brasil: *Cathorops agassizii* (EIGENMANN & EIGENMANN, 1888) distribuído desde a América do Sul, Guiana, Região Nordeste do Brasil, possivelmente até o Estado de Sergipe (Figura 1) (Marceniuk, 2005). *Cathorops arenatus* (VALENCIENNES, 1840) com ampla distribuição na América do Sul, Venezuela e região Norte do estado do Pará, está presente nos habitats estuarinos, ocorrendo também em águas costeiras (Figura 1) (Marceniuk, 2005) e *Cathorops spixii* (SPIX & AGASSIZ, 1829) distribuído na América do Sul, Guiana Francesa à região Sul do Brasil, possivelmente até Paraná, nome popular: Bagre - amarelo (Figura 1) (Marceniuk, 2005).

Muitas espécies incluídas no gênero *Cathorops* apresentam status taxonômico indefinido devido a plasticidade fenotípica, resultando em conflitos taxonômicos observados no gênero (Marceniuk, 2005), tornando um interessante grupo para estudos moleculares adicionais a fim de compreender a taxonomia do grupo.

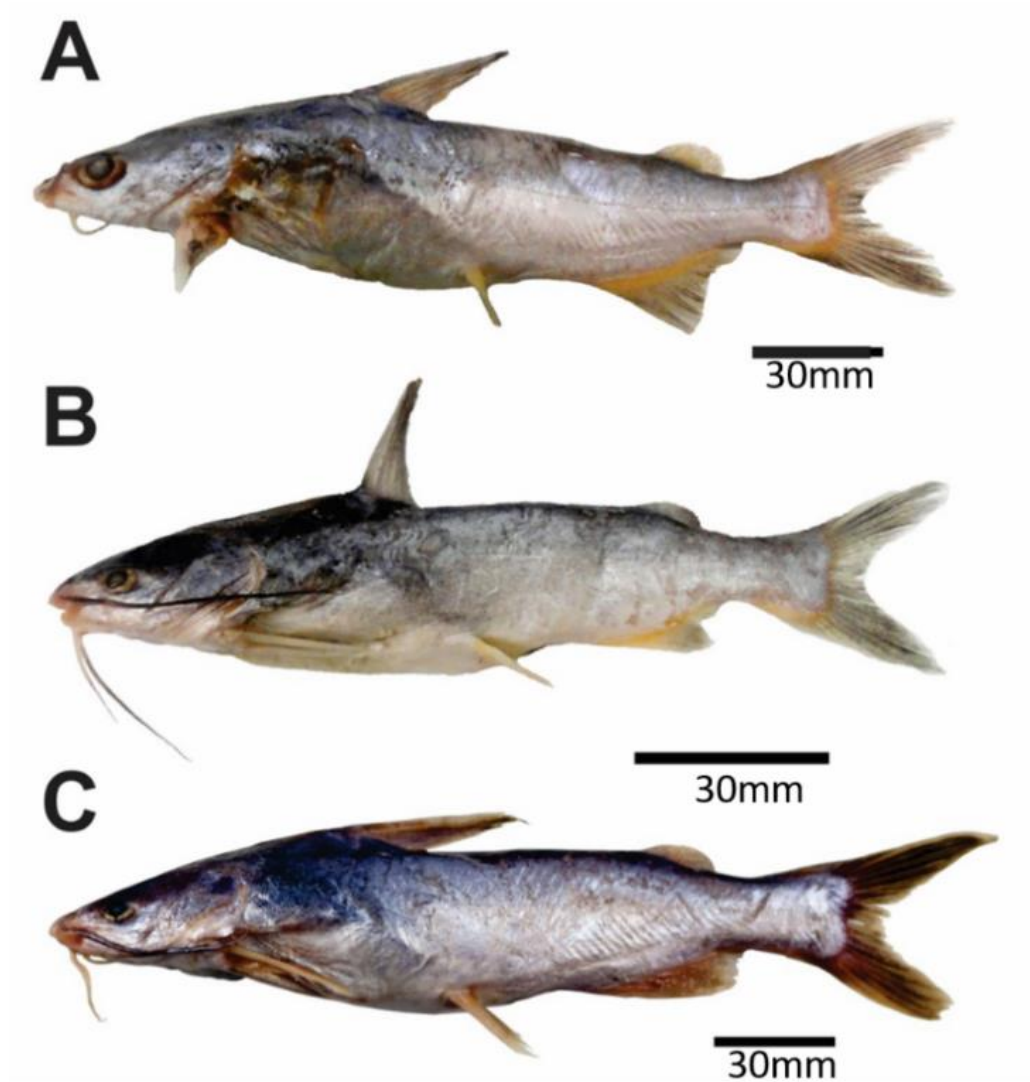


Figura 1. Exemplos das espécies do gênero *Cathorops* coletados na costa norte, nordeste e sudeste do Brasil. **Legenda:** A. *Cathorops agassizii*; B. *Cathorops arenatus*; C. *Cathorops spixii*. **Foto:** Matheus Marcos Rotundo

Um segundo gênero *Genidens* Castelnau 1855, correspondente ao presente estudo apresenta espécies endêmicas da costa na Atlântico Sul da América do Sul (Higuchi, 1982; Marceniuk & Ferraris, 2003). O gênero *Genidens* inclui quatro espécies bem caracterizadas morfológicamente (Higuchi, 1982; Marceniuk, 2005): *Genidens genidens* (Cuvier, 1829) com distribuição somente na costa brasileira, do estado da Bahia ao estado do Rio Grande do Sul, ocorrendo em águas costeiras e regiões estuarinas, conhecido popularmente como bagre-urutu (Marceniuk, 2005); *Genidens planifrons* (Higuchi, Reis & Araujo, 1982) possui distribuição restrita ao estado do Rio Grande do Sul no Brasil, ocorrendo principalmente em regiões de estuário, com preferência em regiões de água costeira (Marceniuk, 2005); *Genidens barbatus* (Lacepède, 1803) apresenta distribuição na América do Sul, do Brasil, com amostragem no Estado do Rio de Janeiro, ao norte da Argentina, habita águas costeiras, estuários e curso inferior de rios, conhecido popularmente como Bagre-branco, Bagre-ariaçu e Bagre-do-mar (Marceniuk, 2005) e *Genidens machadoi* (Miranda-Ribeiro, 1918) com distribuição na América do Sul, a partir do Estado do Rio de Janeiro até Estreito de Magalhães, no Chile, conhecido popularmente como Bagre-do-Corso (Marceniuk, 2005) (Figura 2).

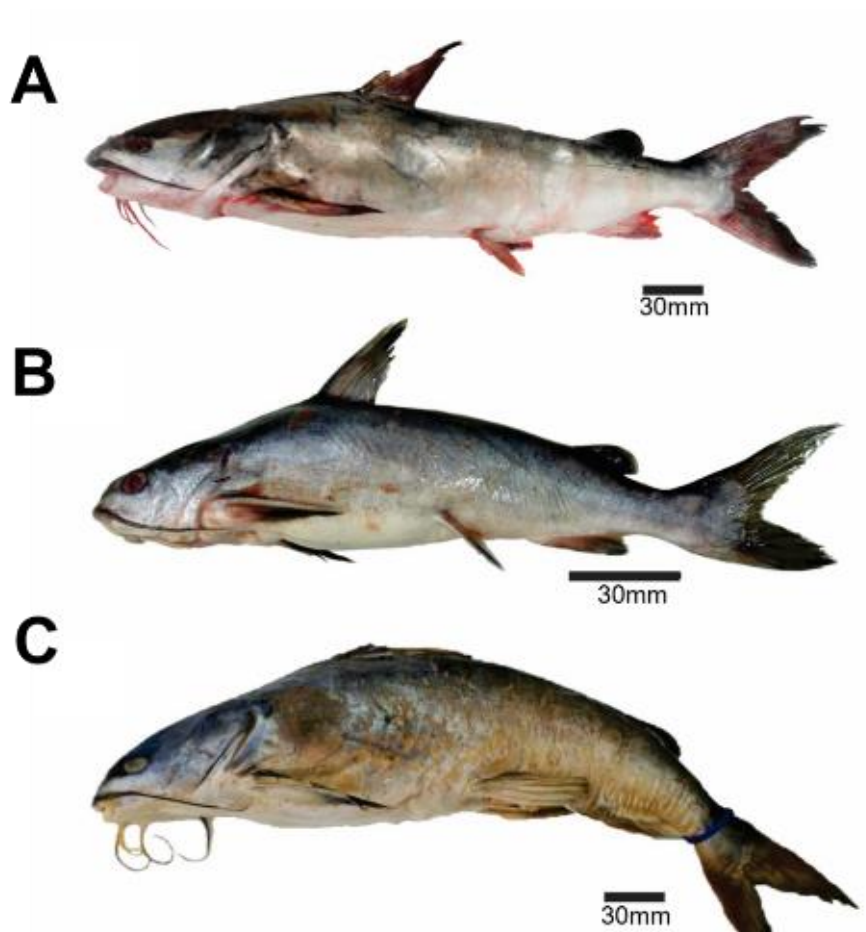


Figura 2. Exemplos das espécies do gênero *Genidens* do presente estudo coletados na costa Sudeste e Sul do Brasil. **Legenda:** **A.** *Genidens barbatus*; **B.** *Genidens genidens*; **C.** *Genidens machadoi*. **Foto:** Matheus Marcos Rotundo.

As espécies *Genidens barbatus*, *G. planifrons* e *G. machadoi* não foram diferenciadas geneticamente pelos marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares) utilizados por Betancur-R (2009). Por outro lado, a definição das espécies de *Genidens* é fundamental para o entendimento de sua biologia e conservação, tendo em vista que essas espécies possuem relevância econômica para pesca comercial e artesanal da região Sudeste e Sul do Brasil, além de apresentarem uma importante função ecológica na manutenção das regiões estuarinas e costeiras (Machado et al., 2012).

A taxonomia e sistemática do grupo de Ariidae é pouco esclarecedora, devido as elevadas similaridades morfológicas, plasticidade fenotípica e pouca consistência dos caracteres utilizados para discriminação das espécies (Marceniuk et al., 2007; Silva et al., 2016; Marceniuk et al., 2017; 2019) podendo representar um excelente modelo de estudo para a compreensão dos processos de especiação no ambiente marinho (Stepien et al., 2001; Betancur-

R et al., 2010). Estes estudos são considerados relevantes, não apenas para a descrição das espécies, bem como, para melhor entendimento da utilização dos recursos relacionados ao habitat e desenvolvimento desses grupos (Barletta-Bergan et al., 2005; Brown et al., 2004).

O desenvolvimento de tecnologias voltadas a genômica e a redução dos custos com o uso de plataformas atuais de sequenciamento de nova geração (NGS), tem contribuído para a genotipagem em larga escala do genoma nas espécies em geral tornado os métodos mais acessíveis (Silva-Junior et al., 2015). Logo, por meio dessas tecnologias, torna-se possível o rastreamento dos locus que estejam relacionados a seleção, deriva genética, fluxo gênico e endogamia (Luikart et al., 2003).

Dentre os métodos com base em NGS, muitos tem como componente principal, o uso de enzimas de restrição específicas para reduzir a complexidade genômica nas espécies alvo (Stapley et al., 2010). O método de redução genômica permite o sequenciamento simultâneo de vários indivíduos ao mesmo tempo, em virtude da combinação de adaptadores ligados a *tags* de DNA associados a cada amostra a ser sequenciada, permitindo assim, discriminar e agrupar as sequências de acordo com cada *tags* (Stapley et al., 2010).

Dentre esses métodos, pode se destacar o RAD-seq (Sequenciamento do DNA associado ao sítio de restrição), um método de sequenciamento de genoma que utiliza enzimas de restrição para cortar o genoma em sítio de restrição específico de uma enzima. A vantagem deste método é uma maior amplitude de cobertura por locus, reduzindo as regiões dos genomas a serem estudados (Miller et al., 2007; Baird et al., 2008).

O uso de RADseq em genômica populacional foi descrito pela primeira vez em Davey & Blaxter. (2010), uma progressão natural do estudo seminal de Baird et al. (2008) sobre o uso de RADseq para genotipar indivíduos utilizando SNPs. O RADseq não requer necessariamente nenhuma informação *a priori* acerca do genoma para os táxons em estudo, podendo ser aplicado em estudos ecológicos e evolutivos de organismos não-modelos (Andrews et al., 2016).

Uma variação para o RADseq é o ddRAD (*double digestion Restriction Associated DNA sequencing*) que utiliza duas enzimas de restrição, seguidas por uma seleção de fragmentos de DNA que são utilizados na construção de bibliotecas (resultando em fragmentos genômicos mais seletivos, além do custo benefício da construção de bibliotecas (Peterson et al., 2012). Esses fragmentos podem conter regiões variáveis referidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). A metodologia do ddRAD utilizando SNPs tem contribuído para estudos em espécies marinhas, respondendo questões acerca da biodiversidade, conservação, espécies em

cultivos e estudos voltados para estruturação populacional (Cayuela et al., 2019, Leone et al., 2019; Saha et al., 2021; Yamahira et al., 2022).

Os marcadores SNPs são polimorfismos como origem por mutações pontuais que se fixaram ao longo do tempo, de bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina), sendo as mutações mais comuns são as transições, nos quais ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A/G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C/T), e as menos frequentes, as transversões quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C/T;A/G) (Caetano et al., 2009).

Estes marcadores estão distribuídos aleatoriamente por todo genoma sendo bastante abundantes, podem ser bialélicos, ou seja, duas variantes alélicas estão segregando na população, ou triallélicos, podendo ser encontrados em genomas humanos (Hodgkinson, et al., 2009), ocorrendo em regiões codificadoras ou em espaços intergênicos do genoma. Além dos marcadores SNPs serem abundantes, suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma (Caetano et al., 2009) e genotipagem de populações em larga escala (Davey; Blaxter, 2010; Poland et al., 2012).

O estudo com SNPs têm contribuído grandemente na resolução de complexos de espécies em peixes (Neves et al., 2021; Behrens et al., 2021; Mérot et al., 2022), genômica populacional (Machado et al., 2020; Benestan et al., 2021; Zhao et al., 2021; I-Kongsstovi et al., 2022) e filogenômica (Olave et al., 2020; Unmack et al., 2022), sendo eficientes e viáveis para estudos de conservação de espécies (Begossi et al., 2021), em virtude de serem marcadores abundantes no genoma (Ganal et al., 2009; Morin et al., 2009). No entanto, não havia estudos voltados a genômica populacional de bagres marinhos utilizando os marcadores SNPs.

Com base no que foi exposto acima, propusemos o presente projeto de pesquisa, que analisou o estudo de genômica populacional das espécies dos gêneros *Cathorops* e *Genidens*, distribuídos na costa do Brasil. Neste trabalho foram utilizados os marcadores SNPs, para gerar dados que permitissem as análises da diversidade e estruturação genética, bem como o fluxo gênico entre as populações das espécies.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo analisar a variabilidade populacional nas espécies dos gêneros *Cathorops* e *Genidens* (Ariidae) para costa do Brasil, utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar a eficiência dos marcadores genômicos SNPs em estudos genéticos populacionais de Ariidae;
- Verificar a variabilidade genética intra e interpopulacional em espécies dos gêneros *Cathorops* e *Genidens*;
- Testar a hipótese de que barreiras biogeográficas estão influenciando os indivíduos das espécies dos gêneros *Cathorops* e *Genidens* a uma estruturação populacional.

3. MATERIAL

No presente estudo foram amostrados na costa Norte, Nordeste e Sudeste, quatro espécies do gênero *Cathorops* (*C. arenatus*, *C. spixii*, *C. agassizii* e *Cathorops* sp.) e na costa Sudeste e Sul três espécies do gênero *Genidens* (*G. genidens*, *G. barbatus*, *G. planifrons*, *G. machadoi*) (Figura 3, Suplementar S1). As coletas foram realizadas com o auxílio de pesquisadores e pescadores colaboradores deste projeto, com amostragem em 12 estados da costa do Brasil, conforme indicado na Figura 3.

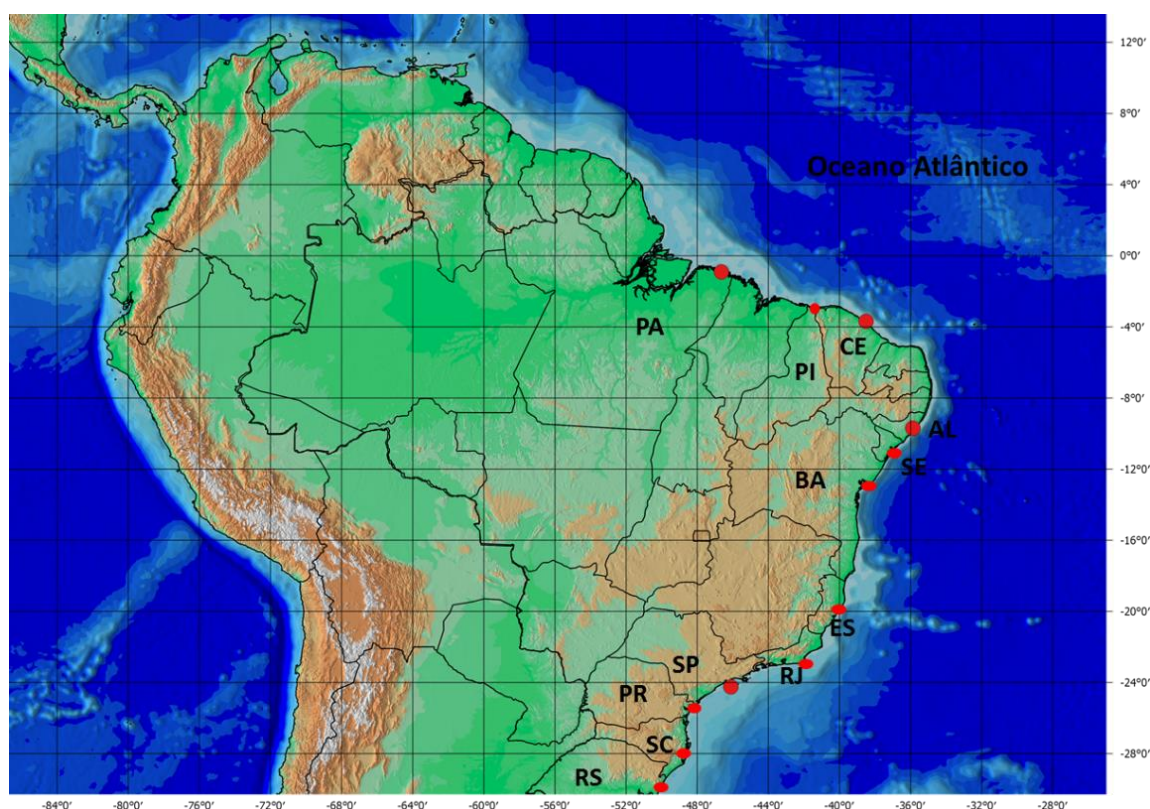


Figura 3. - Mapa ilustrando a amostragem de coleta de espécimes do gênero *Cathorops* e *Genidens*, na costa do Brasil. Em destaque (pontos vermelhos), os estados costeiros Pará (PA); Piauí (PI); Ceará (CE); Alagoas (AL); Sergipe (SE); Bahia (BA); Espírito Santo (ES); Rio de Janeiro (RJ); São Paulo (SP); Paraná (PR); Santa Catarina (SC); Rio Grande do Sul (RS).

As identificações morfológicas foram realizadas pelos taxonomistas Dr. Matheus M. Rotundo e Dr. Alexandre P. Marceniuk com base em chave taxonômica (Marceniuk, 2005) e caracteres fenotípicos em nível de espécie e alguns em gênero. Os peixes foram catalogados e alguns espécimes foram fixados em formol a 10% e posteriormente conservados em etanol 70% para revisão dos espécimes se necessário e depositadas na coleção do Laboratório de Biologia

e Genética de Peixes (LBP), da Universidade Estadual Paulista, UNESP - Botucatu, credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético.

As amostras de tecido muscular, barbilhão e nadadeiras foram coletadas e preservadas em etanol 96% e ambas foram depositadas na coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), da Universidade Estadual Paulista, UNESP - Botucatu.

Além das análises realizadas de genética de populações com os marcadores SNPs, foram inseridas ao conjunto de dados o estudo de identificação molecular com o uso de genes mitocondriais (*CytB* e *ATPase*), a fim de compreender melhor a taxonomia do gênero, e assim, elucidar com mais acurácia as análises populacionais em cada linhagem.

4. MÉTODOS

4.1 DNA *mitochondrial*

4.1.1 Extração do DNA

O DNA total foi extraído a partir de um fragmento de tecido muscular, barbilhão ou nadadeiras preservadas em álcool 95%, utilizando o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA), conforme as instruções do fabricante.

4.1.2 Reação de PCR e Sequenciamento

Os genes mitocondriais Citocromo b (*Cytb*) e as subunidades 8 e 6 da ATP sintase (*ATPase* 8/6) foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um conjunto de *primers* para o gene *CytB* (*CytB* NovoF e *CytB* 08RN) descrito por Claudio Oliveira (comunicação pessoal) e outro para os genes *ATPase* 8/6 (*ATP8.2-L8331* e *COIII.2-H9236*) descrito por S. McCafferty (não publicado).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 µl, contendo: 8,25 µl de água ultra pura (milli-Q); 1,25 µl de tampão para PCR 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 0,4 µl de MgCl₂ (50mM), 0,3 µl de dNTPs (2 mM), 0,5 µl (5 µM) de cada *primer*, 0,2 µl de Taq DNA polimerase PHT (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Brasil; 5U/µl), e 2 µl de DNA (50ng a 100ng). As condições de amplificações foram efetuadas no termociclador (Veriti® 96-

well Thermal Cycler, Applied Biosystems™), utilizando: um passo inicial de pré-aquecimento de 94°C por 5 minutos (min), seguidos por 32 ciclos: desnaturação a 94°C por 40 segundos (s), anelamento a 56°C por 30s e extensão a 68°C por 1 min, seguidos de uma extensão final a 68°C por 8 min. Os produtos de PCR foram verificados via eletroforese, visualizados em gel de agarose 1% corado com GelGreen™ (Biotium, Inc.).

Os produtos de PCR amplificados foram purificados com *ExoSap-IT*® (USB Corporation), seguindo o protocolo do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir dos produtos de PCR purificados, utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems) com reação: 2,9 µl de água ultrapura; 1,05 µl de tampão de sequenciamento 5X; 0,7 µl de Dye Terminator mix v3.1; 0,35 µl do *primer* utilizado da reação de PCR e 1,0 µl do produto de PCR purificado. Os procedimentos utilizados para o protocolo de termociclagem da reação para o sequenciamento consistiram em: 2 min a 98°C seguidos por 35 ciclos de 45 s a 98°C, 1 min a 50°C e 4 min a 60°C.

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados em EDTA, Acetato de Sódio e Etanol (100%), e posteriormente ressuspendido em formamida deionizada para serem inseridos no sequenciador automático de DNA, modelo ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

4.1.3 Edição e alinhamento das Sequências

As sequências obtidas dos genes *CytB* e *ATPase* foram editadas e alinhadas no *software* Geneious 4.2.2 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) para verificar a presença de inserções, deleções ou códons de parada nos fragmentos codificantes para obtenção das sequências consenso. As análises foram comparadas com sequências adicionadas de espécies dos mesmos gêneros em estudo, extraídas do *GenBank* (Betancur-R et al., 2007; Betancur-R, 2009; Betancur-R & Armbruster, 2009).

O conjunto de dados do gênero *Cathorops* incluiu 46 sequências (1.083 *pb*) de 18 espécies, e do gênero *Genidens* com 11 sequências (1.083 *pb*) para quatro espécies. As matrizes para as análises de distâncias genéticas foram construídas entre as espécies de cada gênero. As distâncias inter - e intraespecífica nas espécies foram verificadas utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no *software* MEGA V7.0.26 (Kumar; Tamura, 2016).

O método de distância de Neighbour – Joining (NJ) foi utilizado na construção das árvores, aplicado ao método o modelo K2P suportados por 1.000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

4.2 SNPs

4.2.1 Extração de DNA

No desenvolvimento da biblioteca genômica para obtenção de SNPs, o DNA genômico foi extraído do tecido muscular, nadadeiras ou barbilhão com o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA). A fim de verificar a concentração do DNA as amostras foram quantificadas no *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen), com o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*, após as etapas de quantificação, cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 200ng/μl (Peterson et al., 2012), com volume final de 34 μl e resultando em 5,8 ng/μl.

4.2.2 Construção da biblioteca *ddRAD* para SNPs

A construção das bibliotecas genômicas utilizou o protocolo *ddRADSeq* adaptado por Campos et al. (2017), seguindo as diretrizes de Peterson et al. (2012). A preparação da primeira biblioteca foi feita com 60 indivíduos de gênero *Cathorops* (*Cathorops arenatus* e *Cathorops* sp.) no Laboratório de Pesquisa em Análise Genéticas no Instituto de Biotecnologia (IBETC) da UNESP campus Botucatu, em colaboração com Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla.

A segunda biblioteca foi realizada no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), com um total de 76 indivíduos, os quais 21 indivíduos pertencem ao gênero *Cathorops* e 55 indivíduos ao gênero *Genidens*.

4.2.3 Digestão enzimática

A preparação das bibliotecas genômicas reduzidas iniciou com a reação de dupla digestão enzimática (*Double digest*), utilizamos 34 μl de DNA (5,8 ng/μl), 1 μl de cada enzima *EcoRI* (20U/μl – corte raro) e *MspI* (10U/μl – corte frequente) (Peterson et al., 2012), 4μl TANGO *buffer* (*Cut Smart*), em um volume final de 40μl, o material foi digerido por três horas em temperatura a 37°C.

As amostras do material digerido foram purificadas por *beads* (esferas) utilizando o kit de Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante, eliminando fragmentos de tamanhos menores que 100 pares de bases. Depois da purificação do DNA digerido, quantificamos as amostras novamente no *Qubit*, em seguida realizamos a ligação dos adaptadores.

4.2.4. Ligação de adaptadores

Os adaptadores P1 (2,0 mM) e P2 (5,0 mM) foram ligados aos fragmentos digeridos na reação de ligação, com o volume final de 40µl, com 2,0µl de adaptador específico de cada uma das enzimas, 4µl de T4 Ligase Buffer 1X (Promega), 0,5µl da enzima T4 Ligase (Promega), e 31,5µl do material digerido. Em seguida, as amostras ligadas aos adaptadores foram incubadas a uma temperatura a 23°C em 30 min, 65°C a 10 min, 63°C a 90 s, diminuindo gradativamente a temperatura a cada 2°C em 90 s, até atingir a temperatura de 23°C. Posteriormente, as amostras da reação de ligação dos adaptadores foram purificadas pelas *beads*.

4.2.5 Indexação

Na reação de indexação foram inseridas em cada amostra a sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) H5 e H7 (Nextera DNA CD Indexes), nos incertos ligados aos adaptadores. A reação de indexação constituiu de 15µl do produto de ligação, 5µl de cada index H5 e H7, 25µl de Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), a fim de obter um volume final de 50µl. A correta identificação das amostras foi utilizada uma combinação única de index, com os respectivos *tags*.

A reação de PCR para indexação foi realizada de acordo com as seguintes condições de ciclo: 72°C por 3 min, após, duas etapas de desnaturação a 95°C por 30 s, seguindo-se 16 ciclos a 95°C por 30 s, um passo de anelamento a 55°C por 30 s, um passo de extensão a 72°C por 30 s e a extensão final a 72°C por 5 min. Após a reação de PCR de indexação os *amplicons* foram purificados com as *beads* (microesferas).

4.2.6 Construção do Pool e Size selection

As amostras purificadas foram quantificadas no Qubit, em seguida as mesmas foram padronizadas a uma concentração de 10ng/μl, em seguida, todas amostras foram mescladas em um *pool*, purificado com *beads* e novamente quantificado.

Logo após a quantificação do *pool* foi realizado um *Size selection*, com o objetivo de selecionar o tamanho do fragmento de interesse (300-500 *pb*). A realização do *size selection* o volume total obtido (+/- 40μl), foi inserido no gel de agarose a 1%, corado com o intercalante SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), tendo como peso molecular o 1kb DNA Ladder. Ao final, realizamos o *size selection* (corte) na região do gel de agarose entre 300-500 *pb*.

Após o *size selection* realizamos as etapas de purificação do gel com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante, em seguida, foi realizada a última quantificação no Qubit.

Após a quantificação, a biblioteca foi novamente realizada por PCR em tempo real (qPCR), desta forma, foi possível determinar a concentração da biblioteca para o sequenciamento. Depois desta etapa, a biblioteca foi normalizada e desnaturada. A mesma foi sequenciada com leituras de extremidade única de 150 *pb* (*single end*) na plataforma NGS Illumina Nextseq550 no Laboratório de Pesquisa em Análise Genéticas no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista, UNESP - Botucatu, em colaboração com Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla.

4.2.7 Análise de Bioinformática

Após a etapa de sequenciamento da biblioteca no Nextseq550, foram obtidas as leituras das sequências brutas (*reads-raw date*) pela plataforma Illumina. Foram utilizados dois programas para verificar a acurácia de qualidade das *reads*, FastQC (Andrews, 2018) o qual verifica diferentes parâmetros de qualidade das *reads* de cada amostra, e o MultiQC (<https://github.com/ewels/MultiQC>), que combina os resultados do FastQC e aplica para todas as amostras.

Os dados obtidos por meio destes programas, ilustrados através de gráfico, indicam a presença ou ausência de sequências de adaptadores usados na elaboração da biblioteca, *reads* que apresentam qualidade um *Phred Quality QScore* (Q=10-60) e os tamanhos das *reads* em pares de base (*pb*).

Após a etapa de verificação de qualidade, iniciamos as filtrações utilizando o programa TRIMMOMATIC v.o.32 (Bolger et al., 2014) realizando três filtrações:

1. Remoção de *pb* com presença de adaptadores;
2. Foram removidas *reads* que apresentaram qualidade inferior de QScore = 20 (*Phred QScore*);
3. *Reads* com presença de sítios enzimáticos (*digestão in silico*) foram removidos segundo Driller et al. (2020).

Após estas etapas de filtrações, realizamos uma busca em todas as amostras a fim de identificar o número e o tamanho de *reads* restantes para cada amostra. A maior quantidade das *reads* para as amostras do gênero *Cathorops* apresentavam 142 *pb* (Suplementar S2), e para as amostras do gênero *Genidens* 134 *pb* (Suplementar S3), desta forma, as *reads* foram padronizadas com estes respectivos tamanhos. Posteriormente, iniciamos o rastreamento de marcadores moleculares (SNPs) utilizando a pipeline do programa *Stacks* v. 2.1 (Catchen et al., 2013), para identificar os SNPs.

As espécies do gênero *Cathorops* não apresentaram um genoma de referência, portanto, a montagem do catálogo de marcadores foi realizada com as amostras que apresentaram maior número de *reads* e o rastreamento de SNPs, utilizando a pipeline *de novo* do *STACKS*.

A detecção de SNPs, nesta pipeline utilizou parâmetros *M* e *m*, o *M* controla o número de incompatibilidades permitidas entre os alelos de uma amostra heterozigota, o parâmetro *m* controla o número de *reads* idênticas necessárias para indicar um possível alelo. A melhor definição destes parâmetros foi realizada diferentes testes *m*=2 ao 4, *M*=2 ao 5, como sugerido por Paris et al. (2017). Ao final, foram selecionados *m*=2 e 3, *M*=2 e 3, conforme o conjunto de dados.

Em seguida, com base no catálogo de marcadores desenvolvido pelas análises do *de novo*, foi construído o índice de referência utilizando o programa *Bowtie2* (v2.2.4), posteriormente, foi utilizada a pipeline *Ref map* implementado no *STACKS*, tendo cada amostra alinhada com a referência resultante do *Bowtie2* (v2.2.4), a seguir, para a seleção de SNPs realizada no *populations*. Assim, foram utilizados SNPs que genotiparam pelo menos 50% dos indivíduos de cada população, paralelamente foi aplicado um filtro que eliminasse SNPs que apresentassem valor de MAF (*Minor allele frequency*) <0.03 - 0.05.

A diversidade genética foi verificada pelo o número de alelos privados (*A_p*) utilizando o *populations* do *STACKS*, os valores de Heterozigosidade esperada (*H_E*) e Heterozigosidade observada (*H_O*) através do programa *ARLEQUIN* 3.1 (Excoffier et al., 2010). O índice de

coeficiente de endogamia (F_{IS}) e a probabilidade de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE P -value) através do programa GENEPOP v4.1.0 (Rousset, 2008).

A fim de avaliar a diferenciação genética entre as espécies e populações, foram obtidos os índices de diferenciação genética par-a-par (F_{ST}) (Weir & Cockerham, 1984) utilizando o programa ARLEQUÍN 3.1, o teste múltiplo foi conduzido com 10.000 permutações e os valores significantes (P -value <0,05).

A investigação da estruturação genética entre os indivíduos e as localidades das populações foram analisadas inicialmente segundo a amostragem da costa do Brasil. Uma análise bayesiana foi utilizada com o *software* STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000), e foram testados os valores de K (K variando de 1 a 5) e os parâmetros utilizados nas análises com 1.000.000 de interações de MCMC e *burn-in* de 10%, cada simulação foi replicada 10 vezes para cada K (Evanno et al., 2005).

A identificação do número de *clusters* genéticos (K) foi feita através do método ΔK de Evanno (Evanno et al., 2005), utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER (Earl et al., 2012), e quando o tamanho de amostra populacional era desigual, o valor de K ideal foi estimado pelo *software* STRUCTURE SELECTOR (Li; Liu, 2018) com base no método de Puechmaille (Puechmaille, 2016).

A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) realizada a partir do pacote *adegenet* (Jombart & Ahmed, 2011) foi utilizado no pacote R. Esta análise primeiro transforma os dados usando uma análise de componente principal (PCA), seguida, por uma análise discriminante nas variáveis PCA não correlacionadas, produzindo funções discriminantes sintéticas (eixos) que maximizam a variação entre os grupos enquanto minimizam a variação dentro do grupo (Jombart, Devillard, & Balloux, 2010).

A análise de máxima verossimilhança (ML) dos dados foi realizada em RAxML v8 (Stamatakis, 2014) utilizando o algoritmo de suporte de *bootstrap* para os nós individuais. A melhor busca para árvore de RAxML foi estimada utilizando o parâmetro - N =20, os quais filtra os dados a fim de selecionar o número de execuções probabilísticas em árvores iniciais do número de parcimônia distintas. A filogenia obtida foi visualizada e editada no *FigTree* v1.4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão separados em capítulos correspondentes aos gêneros analisados.

∞ Capítulo 1 - Evidências de diversidade genética e estruturação populacional no complexo taxonômico das espécies do gênero *Cathorops* da costa do Brasil.

∞ Capítulo 2 – Genômica populacional do gênero *Genidens* (Ariidae) para a costa Sudeste e Sul do Brasil.

Capítulo 1-Evidências de diversidade genética e estruturação populacional no complexo taxonômico das espécies ao gênero *Cathorops* na costa do Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação molecular – marcadores mitocondriais

No gênero *Cathorops* foram obtidas 60 sequências, destas, 30 sequências referentes ao gene *CytB* e 30 sequências de *ATPase* 8/6. As sequências foram concatenadas e analisadas em 30 indivíduos (*CytB* / *ATPase* 8/6) do gênero *Cathorops*. Sequências adicionais foram obtidas no banco de dados do *Genbank*.

A identificação baseada nos genes *CytB* e *ATPase* 8/6, através do método Neighbor - Joining (NJ) (Figura 4), mostrou, para a costa do Brasil, a existência de dois grupos, com uma distância genética acima de 2%. O grupo 1 (destacado pela cor azul) apresenta espécimes de *Cathorops agassizii* (n = 10) e *C. spixii* (n=07) e o grupo 2 (evidenciado pela cor laranja), apresenta indivíduos da espécie *C. arenatus* (n = 06) e *Cathorops* sp.(n=08).

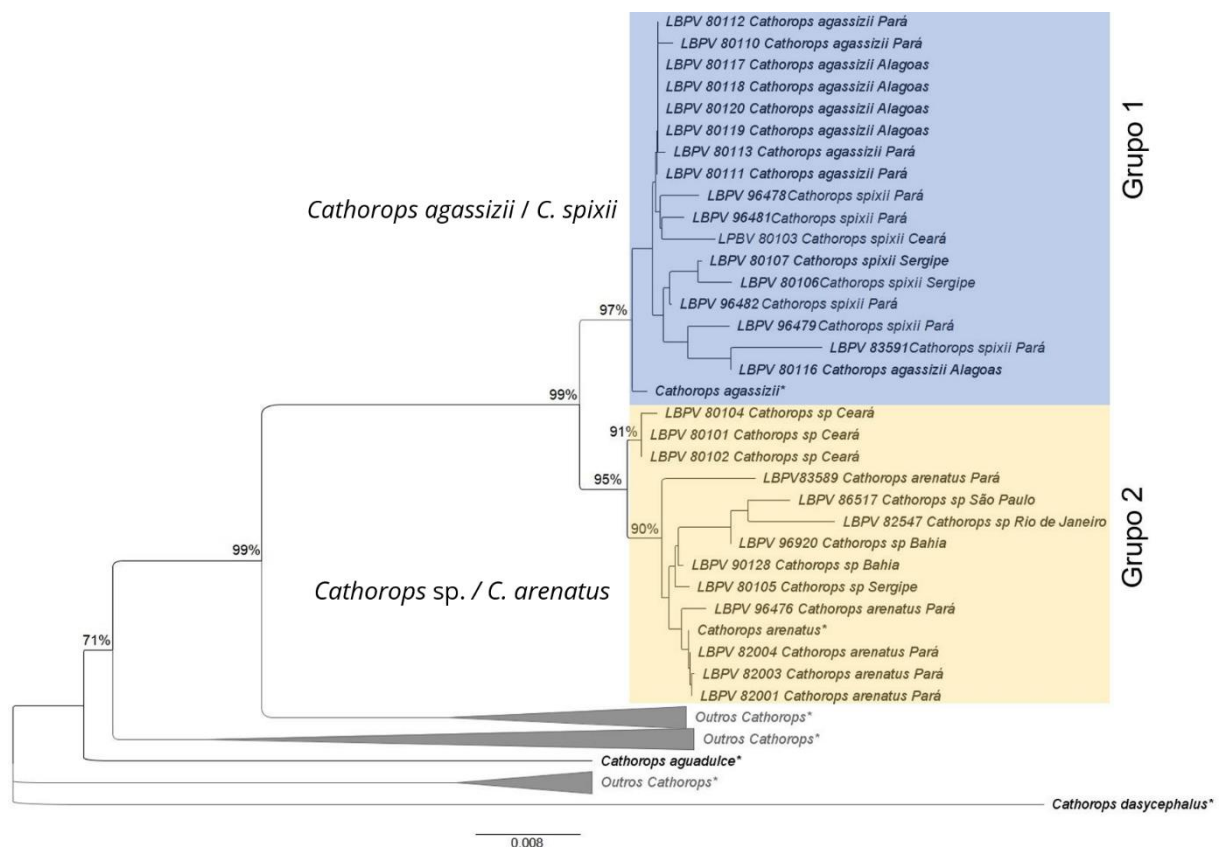


Figura 4. Á árvore de Neighbour - Joining (NJ) obtida em 30 espécimes do gênero *Cathorops* na costa do Brasil, com base nas sequências do gene *CytB* e *ATPase* 6/8. Os números dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 pseudorréplicas). *sequencias obtidas do *GenBank*.

As informações obtidas por NJ, indicam para o grupo 1 que as sequências de ambas as espécies estão mais relacionadas a *C. agassizii*, conforme ilustrado na tabela de distância

genética intraespecífica (0,000) (Tabela 1). As sequências extraídas do *GenBank** foram alocadas em um ramo a parte das demais amostras do presente estudo, com distância genética interespecífica de 0,003 (Tabela 1), indicando que ambas as identificações de *C. agassizii* pertencem a mesma linhagem e a distância genética entre ambas as espécies de 0,005.

É possível observar para o grupo 2 que a distância intraespecífica da espécie *Cathorops* sp. de 0,008 e *C. arenatus* de 0,005. As sequências da espécie *C. arenatus* amostradas no Pará e de *Cathorops* sp. amostradas no Ceará, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo, foram alocadas no mesmo grupo, sendo a distância genética entre as espécies de 0,009 (Tabela 1). Devido as características morfológicas marcantes entre as duas espécies, bem como distribuição e estilo de vida, possivelmente os dois genes mitocondriais não apresentaram variação suficiente para separação entre as duas linhagens

Os demais ramos representam as espécies de *Cathorops* com valores de distância genética interespecífica para as espécies do gênero, apresentando o valor máximo de 0,136 entre *C. tyra* e *C. dasycephalus* e valor mínimo de 0,014 entre *C. arenatus** e *C. agassizii** (Tabela 1).

Tabela 1. Distância genética utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2-parametros (K₂P) entre as espécies do gênero *Cathorops* (abaixo da diagonal) e os erros padrão (acima da diagonal). Os números em negritos correspondem as distancias genéticas interespecíficas das espécies do presente estudo e os números em azul representa as distancias genéticas intraespecíficas K2P.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. <i>Cathorops</i> sp. [♦]	0,008	0,003	0,001	0,003	0,006	0,007	0,007	0,008	0,006	0,008	0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,008	0,009	0,001	0,007	0,003
2. <i>C. spixii</i> [♦]	0,020	0,009	0,003	0,001	0,006	0,007	0,007	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006	0,008	0,006	0,007	0,008	0,009	0,003	0,007	0,002
3. <i>C. arenatus</i> [♦]	0,009	0,019	0,005	0,003	0,006	0,007	0,007	0,008	0,006	0,008	0,007	0,006	0,007	0,006	0,006	0,008	0,009	0,001	0,007	0,003
4. <i>C. agassizii</i> [♦]	0,017	0,005	0,017	0,000	0,006	0,007	0,007	0,008	0,006	0,008	0,007	0,006	0,008	0,006	0,007	0,008	0,009	0,003	0,007	0,001
5. <i>C. wayuu</i> *	0,066	0,065	0,065	0,061	n/c	0,007	0,007	0,007	0,004	0,007	0,002	0,004	0,007	0,004	0,004	0,007	0,010	0,006	0,007	0,006
6. <i>C. tuyra</i> *	0,089	0,084	0,087	0,081	0,082	n/c	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,004	0,007	0,007	0,007	0,010	0,007	0,007	0,007
7. <i>C. taylori</i> *	0,083	0,083	0,081	0,080	0,088	0,069	n/c	0,004	0,007	0,008	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,008	0,009	0,007	0,007	0,007
8. <i>C. steindachneri</i> *	0,091	0,090	0,087	0,088	0,088	0,074	0,028	n/c	0,007	0,008	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,008	0,009	0,007	0,007	0,007
9. <i>C. raredonae</i> *	0,063	0,065	0,061	0,061	0,026	0,084	0,074	0,080	n/c	0,007	0,004	0,003	0,007	0,004	0,003	0,007	0,009	0,006	0,007	0,006
10. <i>C. multiradiatus</i> *	0,097	0,099	0,096	0,095	0,085	0,086	0,091	0,094	0,086	n/c	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,004	0,009	0,008	0,008	0,008
11. <i>C. mapale</i> *	0,065	0,066	0,064	0,062	0,010	0,084	0,088	0,087	0,024	0,085	n/c	0,004	0,007	0,004	0,004	0,007	0,010	0,006	0,008	0,006
12. <i>C. manglarensis</i> *	0,062	0,063	0,061	0,059	0,026	0,080	0,077	0,082	0,015	0,085	0,026	n/c	0,007	0,004	0,003	0,007	0,009	0,006	0,007	0,006
13. <i>C. hypohthalmus</i> *	0,088	0,086	0,087	0,083	0,081	0,027	0,063	0,064	0,078	0,087	0,082	0,079	n/c	0,007	0,007	0,008	0,009	0,007	0,007	0,007
14. <i>C. higuchii</i> *	0,064	0,065	0,062	0,061	0,033	0,082	0,083	0,084	0,029	0,091	0,034	0,031	0,080	n/c	0,004	0,007	0,009	0,006	0,007	0,006
15. <i>C. fuerthii</i> *	0,067	0,068	0,065	0,064	0,029	0,084	0,082	0,088	0,018	0,085	0,029	0,013	0,082	0,035	n/c	0,007	0,009	0,006	0,007	0,006
16. <i>C. festae</i> *	0,096	0,099	0,096	0,095	0,090	0,091	0,089	0,094	0,088	0,020	0,088	0,089	0,092	0,094	0,090	n/c	0,009	0,008	0,008	0,008
17. <i>C. dasycephalus</i> *	0,131	0,133	0,127	0,131	0,134	0,136	0,130	0,132	0,123	0,119	0,134	0,127	0,127	0,132	0,127	0,127	n/c	0,009	0,009	0,009
18. <i>C. arenatus</i> *	0,007	0,018	0,002	0,015	0,063	0,085	0,078	0,085	0,058	0,093	0,062	0,057	0,085	0,059	0,062	0,093	0,123	n/c	0,007	0,003
19. <i>C. aquadulce</i> *	0,087	0,087	0,085	0,084	0,086	0,078	0,084	0,087	0,079	0,091	0,086	0,080	0,077	0,086	0,082	0,094	0,120	0,083	n/c	0,007
20. <i>C. agassizii</i> *	0,016	0,008	0,016	0,003	0,061	0,078	0,079	0,086	0,060	0,092	0,060	0,057	0,080	0,060	0,062	0,092	0,127	0,014	0,083	n/c

[♦]Sequências obtidas no presente estudo.

*Sequências utilizadas do artigo de Betancur – R et al. (2007), extraídas do *GenBank*.

5.2 SNPs

As análises dos dados de sequenciamento de 68 espécimes do gênero *Cathorops*, resultou em um total de 50.351.491 *reads*. Após as filtrações de dados de NGS foram obtidos 38.319.574 *reads*. Após o rastreamento de marcadores e filtrações de dados foi obtido um total de 5.578 SNPs.

5.2.1 Filogenômica

Na compreensão das relações em *Cathorops* realizamos uma análise filogenômica com os SNPs de todos os espécimes do gênero *Cathorops* neste estudo (n=64), resultando em 883 marcadores. A árvore RaxML (Figura 5) alocou a espécie *C. agassizii* (n=21) e *C. spixii* em um ramo com suporte estatístico (99%), contudo, as distâncias dos ramos são menores entre as espécies, sugerindo que ambas são relacionadas geneticamente.

As espécies *C. arenatus* (n=12) e *Cathorops* sp. (n=31) tiveram um valor de bootstrap de 99%, neste ramo podendo ser notado uma segregação entre as duas espécies de *C. arenatus* e *Cathorops* sp. (Figura 5).

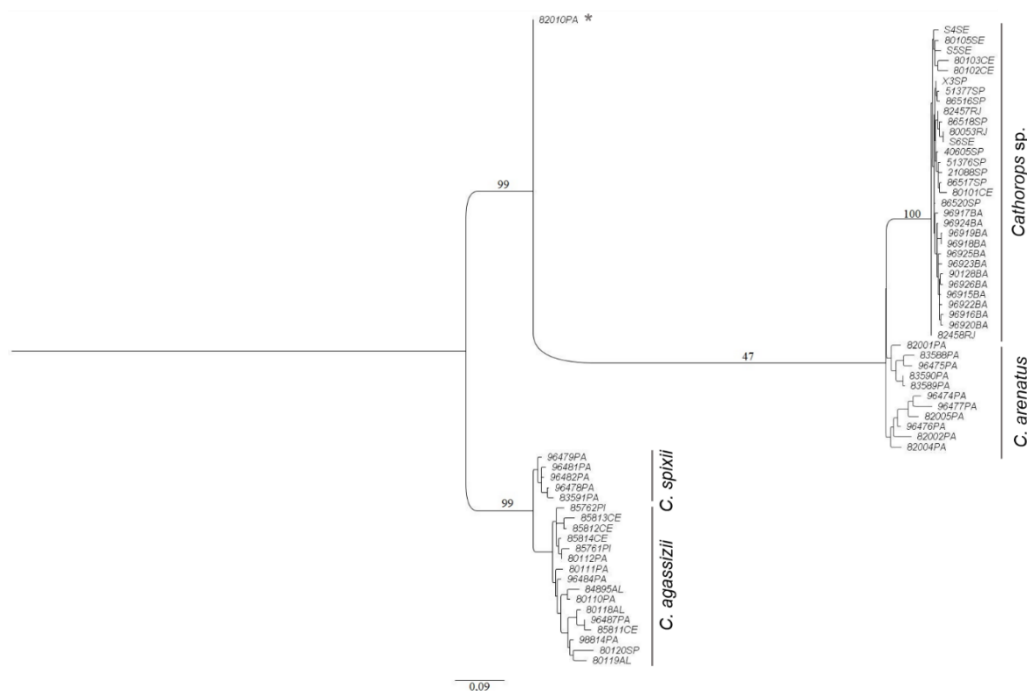


Figura 5. Relações filogenômicas do gênero *Cathorops* na costa do Brasil, com base na análise de RaxML com 883 SNPs. Os valores de *bootstrap* são exibidos nos nós.

*Evidências de híbrido para a amostra 82010PA.

5.2.2 Genômica Populacional

As análises bayesianas no STRUCTURE (Figura 6A) pelo método de Puechmaille, indicou o valor provável de $K=3$ (MaxMedk=3), mostrando a distribuição de três *clusters*, um *cluster* (cor azul) representado pelos indivíduos da espécie *C. agassizii* ($n=22$) com amostras da costa Norte e Nordeste e cinco indivíduos da espécie *C. spixii* amostradas da costa Norte. O segundo *cluster* (cor verde) para os indivíduos da espécie *C. arenatus* ($n=14$) amostrado na costa Norte e o terceiro *cluster* (cor vermelho), relacionado aos indivíduos da espécie *Cathorops* sp. ($n=32$) amostrado na costa Nordeste e Sudeste, sugerindo a presença de três espécies de *Cathorops* (Figura 6B).

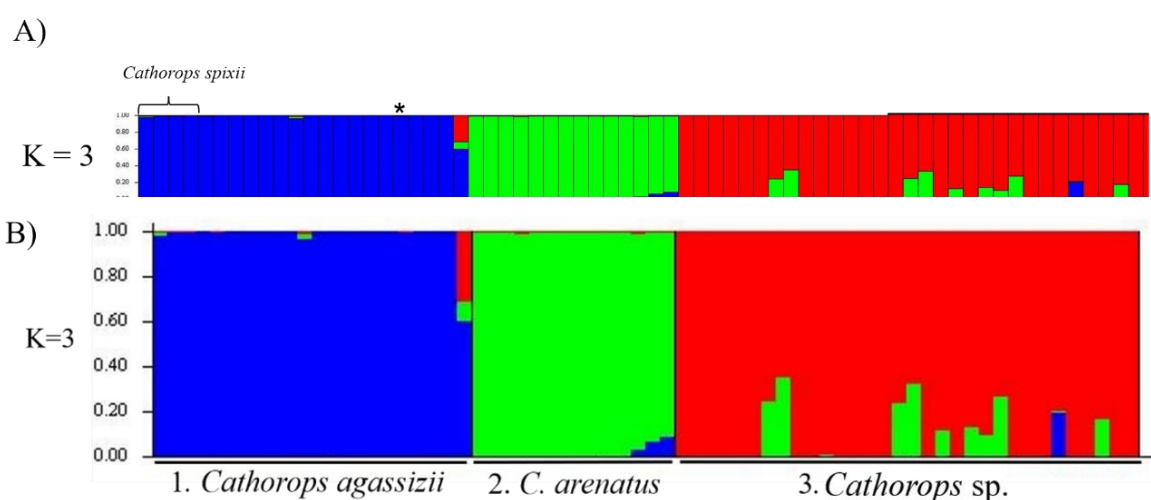


Figura 6. A. A análise Bayesiana ($K=3$) realizada para as espécies do gênero *Cathorops* na costa do Brasil, com 5.478 SNPs, cada barra corresponde aos indivíduos amostrados das espécies, * corresponde a um indivíduo da espécie *C. spixii*. **B.** Gráfico do Structure para as espécies do gênero *Cathorops*.

Em reflexo a análise bayesiana do STRUCTURE indicando três *clusters* ($K=3$), os cinco indivíduos identificados morfologicamente como *Cathorops spixii* (Figura 6A) foram alocados no *cluster* formado pela linhagem *C. agassizii*, a partir deste resultando essas duas espécies foram tratadas como a mesma linhagem de *C. agassizii*.

A análise de diferenciação genética (F_{ST}) par-a-par entre as espécies *Cathorops agassizii* e *C. arenatus* indicou um valor de $F_{ST}=0,309$ (P -value 0.0000 ± 0.0000), entre as espécies *C. agassizii* e *Cathorops* sp. $F_{ST} = 0,555$ (P -value 0.0000 ± 0.0000) e para as espécies *Cathorops* sp. e *C. arenatus* $F_{ST} = 0,128$ (P -value 0.08237 ± 0.0026) (Tabela 2), sugerindo pelos índices de F_{ST} significativas diferenças entre elas, indicando três distintas linhagens no gênero *Cathorops*.

Tabela 2. Análise de estruturação par-a-par de F_{ST} entre as espécies do gênero *Cathorops*, na costa do Brasil. Abaixo da diagonal valores de F_{ST} e acima valores de P -value.

F_{ST}	<i>C. agassizii</i>	<i>C. arenatus</i>	<i>Cathorops</i> sp.
1. <i>C. agassizii</i>		0.0000±0.0000	0.0000±0.0000
2. <i>C. arenatus</i>	0,309		0.08237±0.0026
3. <i>Cathorops</i> sp.	0,555	0,128	

As Análises Discriminante de Componentes Principais (DAPC) corroboram com as informações obtidas no STRUCTURE, identificando três linhagens entre os 68 indivíduos (Figura 7), correspondendo as espécies *C. arenatus* (1, cor amarela); *C. agassizii* (2, cor azul) e *Cathorops* sp. (3, cor vermelho).

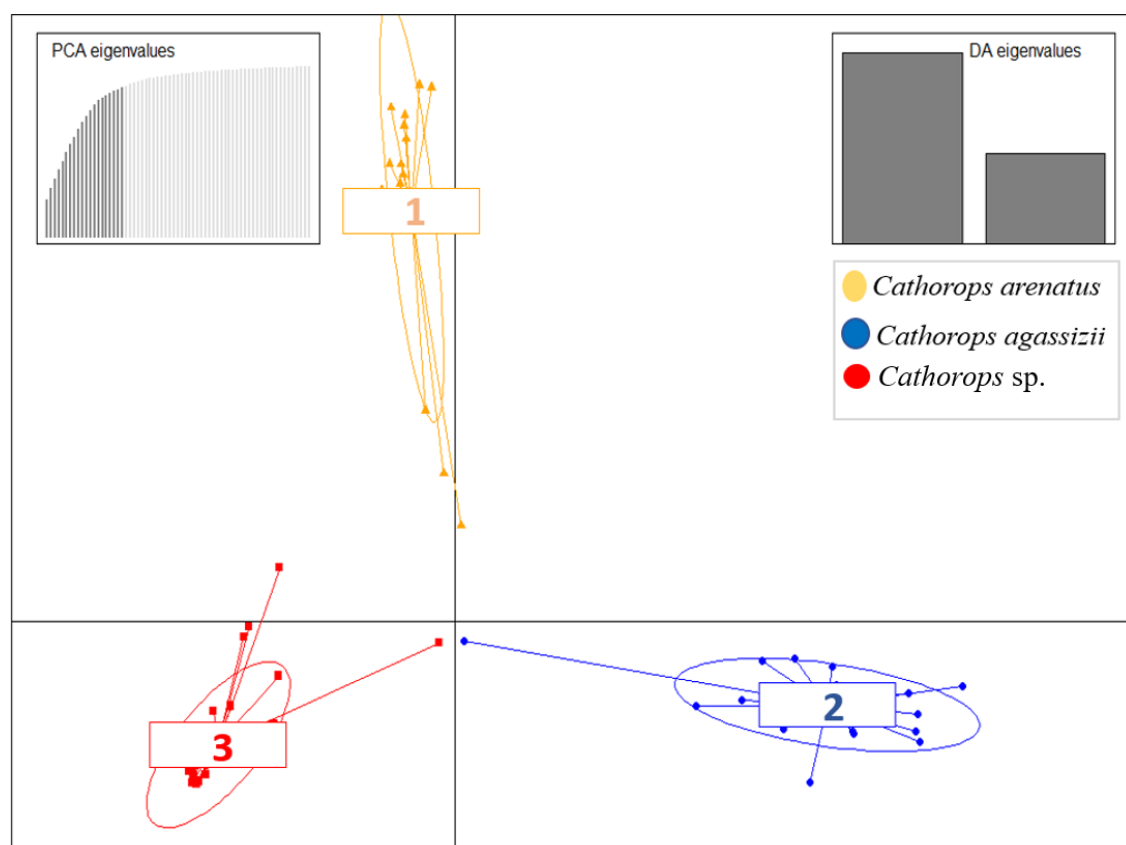


Figura 7. Gráfico de análise discriminantes de componentes principais (DAPC) para 5.478 SNPs em três linhagens do gênero *Cathorops*.

A fim de obter uma melhor compreensão sobre a dinâmica das populações foram elaborados novos rastreios de SNPs especificamente para cada espécie, e assim, realizadas análises intraespecíficas de diversidade genética e estrutura populacional.

A espécie *C. arenatus* reteve 984 SNPs de 14 espécimes. Entre os índices de diversidade genética foi obtido o índice de Heterozigosidade observada (H_O)=0,126 e Heterozigosidade esperada (H_E)=0,154, coeficiente de endogamia (F_{IS})=0,310 (Tabela 3). Estes resultados de diversidade genética indicaram um excesso de homozigotos e endogamia em *C. arenatus* na costa norte do Brasil.

Tabela 3. Índices de diversidade genética para as espécies do gênero *Cathorops* para as regiões amostradas da costa do Brasil.

Espécies	Localidade	N	Ap	H _O	H _E	F _{IS}
<i>Cathorops arenatus</i>	Norte	14	-	0,126	0,154	0,310
<i>C. agassizii</i>	Norte	12	890	0,083	0,134	0,597
	Nordeste	10	1,162	0,157	0,177	0,447
<i>Cathorops sp.</i>	Nordeste	19	335	0,265	0,300	0,101
	Sudeste	13	36	0,186	0,236	0,016

N: Número de amostras, Ap: Número de alelos privados, H_O: Heterozigosidade observada, H_E: Heterozigosidade esperada, F_{IS}: Coeficiente de endogamia.

O conjunto de dados referente a espécie *C. agassizii* resultou em 5.753 SNPs para 22 indivíduos. A diversidade genética na costa Norte (n=12) evidenciou um total de Ap=890, com valores de H_O=0,083 e H_E=0,134 e índice de F_{IS}=0,597. Na costa Sudeste (n=10) o número de Ap=1,162, o valor de H_O=0,157 e H_E=0,117, e o valor de F_{IS}=0,447 (Tabela 3). Os dados de diversidade genética indicam a ocorrência de homozigotos e endogamia para ambas as localidades.

A estimativa de estruturação genética par-a-par (F_{ST}) entre a costa Norte e Nordeste indicou valor de F_{ST} =0,025 (P -value 0,14844±0,0109) (Tabela 4), sugerem ausência de estruturação genética entre as regiões.

Tabela 4. Resultado da análise de F_{ST} das espécies do gênero *Cathorops* entre as regiões amostradas. Os números destacados pela cor cinza indicam os valores de P -value.

F_{ST}	Região	NE	SE
<i>Cathorops agassizii</i>	Nordeste (NE)		0,14844±0,0109
	Sudeste (SE)	0,025	
<i>Cathorops sp.</i>	Nordeste		0,0000 ± 0,0000
	Sudeste	0,070	

A análise bayesiana do STRUCTURE pelo método de Evanno foi de $K=2$ (Delta $K=939,57924$), resultando em dois *clusters*, um *cluster* (cor vermelho) composto por cinco indivíduos na costa norte (LBPV 96478; 96479; 96481; 86482 e 83591) os quais compartilham alelos com os demais do nordeste, e um segundo *cluster* (cor verde) nos indivíduos do norte e nordeste (Figura 8).

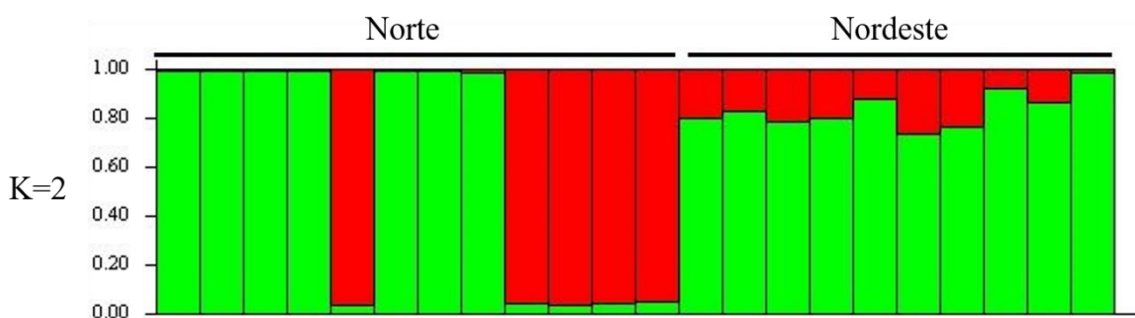


Figura 8. Bar plot de análise do STRUCTURE para a espécie *Cathorops agassizii* pelo método de Evanno de $K=2$ para costa Norte e Nordeste do Brasil.

Uma segunda análise de diferenciação genética foi realizada de acordo com os *clusters* identificados pelo STRUCTURE para melhor compreensão dos dados. O resultado indicou um valor de $F_{ST} = 0,046$ (P -value $0,9851 \pm 0,027$) (Tabela 5), sugerindo ausência de estruturação genética, assumindo uma única população para a espécie *C. agassizii*.

Tabela 5. Análise par-a-par de F_{ST} baseados nos *clusters* obtidos pelo STRUCTURE. Os números marcados com as respectivas cores, são correspondentes os *clusters* identificados pelo STRUCTURE. Valores destacados na cor cinza, indicam os valores de *P-value*.

F_{ST}	<i>Clusters</i>	1	2	3
<i>Cathorops agassizii</i>	1		0,9851±0,027	
	2	0,046		
<i>Cathorops</i> sp.	1		0,00059±0,0002	0,00188±0,0004
	2	0,168		0,0000±0,0000
	3	0,289	0,108	

Em *Cathorops* sp. foram obtidos um total de 6.879 SNPs em 32 indivíduos os quais as análises de diversidade genética indicaram para costa Nordeste (n=19) $A_p=6,075$, os índices de $H_o=0,246$ e $H_e=0,277$ e coeficiente de endogamia $F_{IS}=0,106$. Na costa Sudeste (n=13) a diversidade genética revelou valores de $A_p=3,287$, os índices de $H_o=0,174$ e $H_e=0,203$ e o valor de $F_{IS}=0,013$ (Tabela 3), indicando um excesso de homozigotos e endogamia para a costa nordeste e sudeste.

Os resultados de diferenciação genética em *Cathorops* sp. entre as localidades do nordeste e sudeste resultou em $F_{ST}=0,070$ (*P-value* 0,00010±0,0001), indicando estruturação genética entre as localidades. A análise Bayesiana realizada no STRUCTURE, utilizando o método Evanno, indicou um valor de K mais provável de K=3 (Delta K=239,03252) (Figura 9), ilustrando a probabilidade de três *clusters* para a espécie. No primeiro *cluster* (cor verde) estão representados os indivíduos amostrados do Ceará, no segundo *cluster* (cor vermelho) indivíduos de Sergipe (SE), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP), e o terceiro *cluster* (cor azul) indivíduos amostrados no Espírito Santo (ES) e Bahia (BA) (Figura 9).

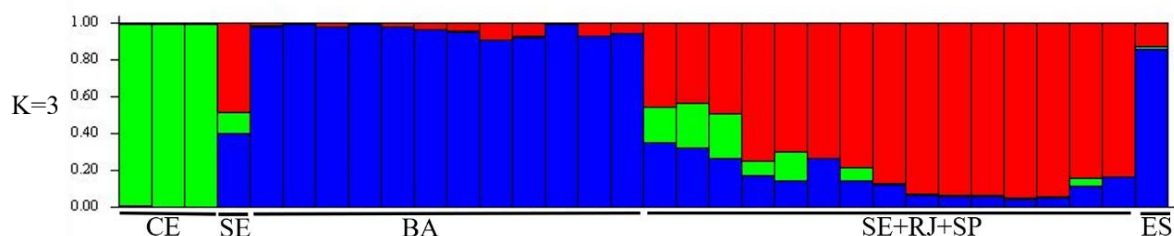


Figura 9. Demonstração gráfica da análise Bayesiana do STRUCTURE com 6.789 SNPs para a espécie *Cathorops* sp. com valor de K=3 para costa Nordeste e Sudeste do Brasil.

Novamente foi realizada a análise de diferenciação genética (F_{ST}) baseada nos *clusters* obtidos no STRUCTURE, no qual revelou entre o *cluster* 1 e 2 o valor de $F_{ST}=0,168$ ($P\text{-value } 0,00059\pm 0,0002$), entre o *cluster* 1 e 3 o valor de $F_{ST}=0,289$ ($P\text{-value } 0,00188\pm 0,0004$) e $F_{ST}=0,108$ ($P\text{-value } 0,0000\pm 0,0000$) entre o *cluster* 2 e 3 (Tabela 5), indicando estruturação genética entre os *clusters* para a espécie *Cathorops* sp.

6. DISCUSSÃO

O estudo apresenta a primeira investigação genômica em espécies do gênero *Cathorops* coletadas nas costas Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. Inicialmente, com o uso da identificação molecular (mtDNA), foi possível identificar *Cathorops agassizii*/ *C. spixii* e *Cathorops* sp. e *C. arenatus*.

As análises filogenômicas, com a utilização de SNPs, identificaram três espécies para o gênero: *C. agassizii*, *C. arenatus* e *Cathorops* sp. Além disso, a investigação populacional revelou diversidade genética intra e interpopulacional. Ainda foi detectada uma baixa diversidade genética para as espécies do gênero, com estruturação populacional significativa somente em indivíduos da espécie *Cathorops* sp. entre a costa Nordeste e Sudeste do Brasil.

Identificação das espécies do gênero Cathorops

A identificação morfológica das espécies do gênero *Cathorops* é complexa devido a plasticidade fenotípica, podendo ser influenciada pelas características ambientais específicas que podem resultar na diferenciação e manutenção das linhagens (Marceniuk, 2005b, 2007; Marceniuk & Betancur-R, 2008; Marceniuk, Betancur-R, & Acero, 2009, Marceniuk, Menezes, & Britto, 2012), mesmo assim algumas espécies são difíceis de serem discriminadas, resultando em espécies sinonímias para o gênero.

Mediante ao uso de genes mitocondriais (mtDNA) foram possíveis identificar dois grupos distintos, um referente a espécimes previamente identificados como *Cathorops agassizii* (n=10) e *C. spixii* (n=07), e outro representado por indivíduos inicialmente identificados como *C. arenatus* (n=06) e *Cathorops* sp. (n=08). Entretanto, as distâncias genéticas intraespecíficas dos grupos foram baixas (>0,007) sugerindo que as amostras poderiam corresponder a uma única espécie.

A ausência de diferenciação genética em dados mitocôndrias foi identificada entre outras espécies de bagres marinhos do gênero *Aspistor* (*A. quadriscutis* e *A. luniscutis*), que, segundo autores, pode ser devida à uma história evolutiva recente de separação das espécies pertencentes ao gênero (Marceniuk et al., 2019). Segundo Marceniuk et al. (2017), revisando um complexo de espécies de *Notarius grandicassis* do nordeste da América do Sul e *N. parmocassis*, do leste e sul do Brasil não encontraram diferenças genéticas entre essas linhagens com sequências mitocondriais de *CytB* e *ATPase 8/6*,

embora tenham sido reescritas morfológicamente como linhagens distintas. Este conflito taxonômico pode estar relacionado a recente história evolutiva dessas espécies (Betancur-R, 2009), que são encontradas em localidades geográficas distintas com condições ambientais específicas, como visto para as espécies *C. arenatus* e *Cathorops* sp.

Evidências com marcadores mitocondriais, nucleares e genômicos, em espécies da família Ariidae foram realizadas a fim de compreender os mecanismos de especiação e a evolução dos caracteres morfológicos (Betancur-R et al., 2007; Marceniuk & Menezes, 2007; Betancur-R, 2009; Betancur-R et al., 2010; Stage et al., 2018), todavia, ainda há um *gap* acerca deste assunto, pois a morfologia do gênero é complexa (Marceniuk et al., 2012).

A árvore filogenômica de RAxML com SNPs *a priori* evidencia dois ramos, as espécies *C. agassizii*/ *C. spixii* e *C. arenatus*/*Cathorops* sp., sugerindo a hipótese de que as mudanças na costa da América do Sul ocorridas no período do Mioceno (Bush & Oliveira 2006) ao Pleistoceno (Ludt & Rocha, 2015), podem ter resultado na divergência destes grupos. Tais mudanças têm sido associadas a refúgios glaciais em espécies em táxons marinhos costeiros de águas tropicais (Ludt & Rocha, 2015).

Achados semelhantes de divergência genética em outras espécies estuarinas relacionadas a esses eventos (Silva et al., 2018; Neves et al., 2021; Aderne et al., 2022) evidenciam os efeitos dos ciclos glaciais ocorrentes nos períodos do início do Pleistoceno, como um fator determinante para o atual isolamento de espécies de peixes costeiras, bem como em bagres marinhos da costa da América do Sul (Silva et al., 2016; Marceniuk et al., 2017; 2019a; 2019b; 2022).

As análises de filogenômica segregou as espécies *C. arenatus* e *Cathorops* sp. considerando ambas linhagens distintas e com suporte estatístico (*bootstrap* > 100%) para a espécie *Cathorops* sp. Estes dados e os SNPs, possivelmente possibilitam discriminar ambas as linhagens, os quais não foram resolutivos com o uso de marcadores mitocondriais. O uso de SNPs em espécies marinhas tem evidenciado a confiabilidade destes marcadores para auxiliar em conflitos taxonômicos (Pedraza-Marron et al., 2019; Neves et al., 2021; Fahmi et al., 2021).

A hipótese para a efetividade de considerar as duas espécies pode ser relacionada ao fato de que ambas compartilham alguns alelos, possivelmente sugerindo uma relação a um ancestral comum, como ilustrado pelo gráfico do STRUCTURE e o valores de F_{ST} , indicando que são duas espécies distintas mais que apresentam relação genética, com base

nos resultados genômicos populacionais do gênero. Os dados filogenômicos corroboram os resultados significativos de diferenciação genética (F_{ST}) par-a-par, do STRUCTURE e a DAPC, os quais, sugerem uma diferenciação moderada a espécie *Cathorops* sp. como uma linhagem distinta das espécies *C. arenatus* e *C. agassizii*.

No geral, a heterozigosidade observada estimada em *C. arenatus*, em *C. agassizii* e *Cathorops* sp. evidenciaram baixos valores ($< 0,265$) em relação a esperada ($< 0,300$), que associados aos valores positivos de F_{IS} indicam excesso de homozigotos e endogamia.

O valor das heterozigosidade das espécies *Cathorops arenatus* e *C. agassizii* do presente estudo, são próximos ao encontrado em espécies que também apresentam o mesmo tipo de ciclo biológico, como em *Sparus aukata* (Gkagkavouzis et al., 2021), sendo para a espécie *Cathorops* sp. os índices de heterozigosidade próximos as espécies *Sillago japonica* (Yang et al., 2020) e superior a espécie *Brachionichthys hirsutus* (Appleyard et al., 2021) (Tabela 6). No geral, ambos os valores de heterozigosidade indicam excesso de homozigotos e a presença de endogamia associados aos valores de F_{IS} , estando, os mesmos presentes nas espécies do gênero *Cathorops*.

Tabela 6. Comparação da diversidade genética em outras espécies de peixes marinhos. Os valores apresentados são os valores máximos de H_O e H_E .

Gênero/Espécie	H_O	H_E	F_{IS}	Trabalhos
<i>Brachionichthys hirsutus</i>	0,282	0,310	Positivo	Appleyard et al., 2021
<i>Cathorops arenatus</i>	0,126	0,154	Positivo	Presente estudo
<i>Cathorops agassizii</i>	0,157	0,177	Positivo	Presente estudo
<i>Cathorops</i> sp.	0,265	0,300	Positivo	Presente estudo
<i>Sillago japonica</i>	0,215	0,200	Positivo	Yan Yang et al., 2020
<i>Sparus aukata</i>	0,150	0,160	Positivo	Gkagkavouzis et al., 2021

Estruturação genética nas populações de Cathorops agassizii e Cathorops sp.

Segundo Wright (1978), valores de F_{ST} entre $< 0,05$; $0,05$ e $0,015$; e $0,15$ e $> 0,25$ indicam baixo nível ou ausência, moderada, alta e elevada estruturação genética. A espécie *C. agassizii* apresentou valor não significativo de F_{ST} ($P\text{-value} > 0,05$) menor que $0,05$, sugerindo ausência de estruturação entre os indivíduos da costa Norte e Nordeste do Brasil. Os dados do STRUCTURE de $K=2$ e o valor de F_{ST} entre os *clusters* foram similares entre as costas, sugerindo a presença de uma única população entre os espécimes da costa Norte e Nordeste do Brasil.

Em um estudo com SNPs foi possível verificar a ausência de estruturação genética significativa entre as populações para a espécie *Mugil curvidens* amostrados entre dois estuários da costa do Nordeste brasileiro com distâncias de 38 km, evidenciando que o habitat heterógeno composto por recifes de corais e plumas recorrentes de sedimentos dos rios, não restringem o fluxo gênico dos estuários da costa Nordeste abrigando uma população panmítica de *M. curvidens* (Neves et al., 2021). Desta forma, pode-se aplicar esta hipótese na espécie *C. agassizii*, cujo os habitats heterogêneos (temperatura, sedimentos, salinidade) dos estuários do norte em relação aos do Nordeste não restringem o fluxo gênico mantendo a conectividade genética da população entre as costas.

Dantas et al. (2011) em estudo nos estuários do Nordeste obtiveram resultados importantes para as espécies de *C. spixii* e *C. agassizii* demonstrando que as variações na ecoclina sazonal, principalmente o gradiente de salinidade e o oxigênio, podem definir a distribuição e os movimentos das espécies ao longo de um gradiente espacial em todas as fases ontogenéticas nos três habitats do canal do estuário de Goiana no estado de Pernambuco (superior, médio e inferior). Além disso, as flutuações sazonais na salinidade (final seco e final chuvoso) e o oxigênio dissolvido (precoce chuvoso e final seco) definiram o papel de berçário, e uma densidade e biomassa relativa em juvenis de ambas as espécies no meio do estuário durante o início da estação chuvosa.

A análise de estruturação genética do STRUCTURE da espécie *Cathorops* sp. indicou a presença de três *clusters* presentes na costa Nordeste, Leste e Sudeste do Brasil. Os valores F_{ST} foram significativos ($p < 0,05$), evidenciando uma estruturação genética entre os indivíduos das populações amostrados no estado do Ceará (CE); Bahia (BA) / Espírito Santo (ES) e entre Sergipe (SE) / Rio de Janeiro (RJ) / São Paulo (SP).

As condições ambientais distintas da costa do Nordeste e Sudeste do Brasil, como níveis de salinidade, temperatura e eventos biogeográficos (variações do nível do mar) do período quaternário, podem ter contribuído para a restrição do fluxo gênico nas populações da espécie de *Cathorops* sp. da costa Nordeste (CE), Leste (BA e ES) e Sudeste (SE, RJ e SP) do Brasil, como exemplo em espécies de *Bagre bagre* (Silva et al., 2016) *Menticirrhus americanos* (Freitas et al., 2017) e *Atherinella brasiliensis* (Baggio et al., 2017).

A ausência de alelos compartilhados dentro da população do CE e os valores de F_{ST} entre as populações da costa Leste (BA+ES) e Sudeste, sugere a hipótese que a distância geográfica entre as costas pode estar relacionada a estruturação genética, devido

a população do Nordeste indicar baixo fluxo gênico com populações mais distantes geograficamente. Esta hipótese além de apontar a distância de uma costa a outra, (principalmente da costa Sudeste), pode se tratar de habitat preferencial por essa espécie, como exemplo no Ceará, por apresentar águas mais quentes e salina além de estuários mais amplos, resultando muitas vezes em lagoas com trechos para mangues (Kjerfve & Lacerda, 1993).

Em contrapartida, as águas da costa Leste são mais quentes e salinas, tendo pouca presença de rios, sendo as bacias mais significativas da costa Leste: Jequitinhonha (Bahia) e a bacia Doce (Espírito Santo). Em relação, as águas do Sudeste, mais frias e menos salinas (Rossi-Wongtshchewski et al., 2006), essas variações ambientais podem estar influenciando o fluxo gênico entre as populações da costa Leste e Sudeste do Brasil. Neste caso, para as populações da costa Leste e Sudeste, estas características contribuem para restrição do fluxo gênico evidenciado pelo valor de F_{ST} .

Todavia, devido ao baixo número de indivíduos coletados na costa do Nordeste (CE), é necessário aumentar o número amostral da distribuição nesta localidade a fim de compreender melhor o dinamismo dos espécimes nessa região. Possivelmente os indivíduos da localidade do SE incluídos a população Sudeste foram coletados em áreas onde há uma população não residente, explicando a presença destes indivíduos da população do Sudeste.

A presença de barreiras biogeográficas simboliza em desafios para compreender os mecanismos que levam a estruturação de espécies marinhas em regiões estuarinas e costeiras, e a complexidade da taxonomia morfológica no gênero em estudo leva a necessidade de análises moleculares afim de compreender os táxons.

Embora a espécie *C. agassizii* não tenha apresentado estruturação populacional, é relevante conhecer a biologia da espécie e compreender como a mesma se adapta a ambientes heterogêneos sem que haja na população alterações no fluxo gênico. Diferentemente pode ser observado estruturação populacional nas três populações em *Cathorops* sp. indicando que distância geográfica e as barreiras biogeográficas podem influenciar o fluxo gênico nas populações distribuídas na costa do Brasil.

Capítulo 2 - Genômica populacional do gênero *Genidens* (Ariidae) para a costa Sudeste e Sul do Brasil

7. RESULTADOS

7.1 Identificação molecular

As análises de identificação molecular utilizando genes mitocondriais *CytB* e *ATPase* 6/8 contaram com oito amostras do gênero *Genidens* no presente estudo. As sequências foram adicionadas ao conjunto de dados do *GenBank*, totalizando representantes de quatro espécies: *Genidens barbus*, *Genidens genidens*, *Genidens machadoi* e *Genidens planifrons*.

A árvore de NJ com base nos genes mitocondriais indicaram a presença de dois grupos (azul e vermelho) para o gênero. As amostras deste estudo identificadas morfologicamente como *G. genidens*, *G. barbus* e *G. machadoi* coletadas no Brasil, alocaram-se no mesmo grupo (Figura 10), evidenciando uma estreita relação entre essas espécies.

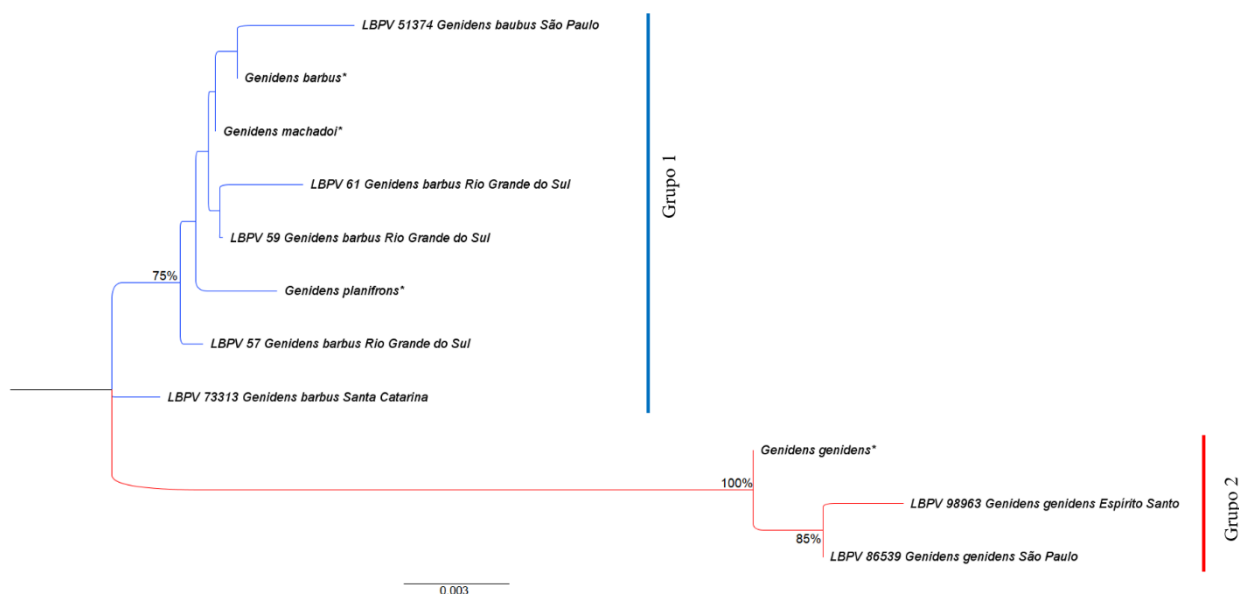


Figura 10. Árvore de NJ com sequências do gene *CytB* e *ATPase* 8/6 do gênero *Genidens*. **Legenda:** *Sequências extraídas do banco de dados *GenBank*, como ilustrado na tabela de distância genética. LBPV é a sigla das sequências resultantes do presente estudo.

No geral, o menor valor interespecífico foi observado entre as espécies *G. barbus* e *G. machadoi* de 0,001, sendo o maior valor (0,026) entre as espécies *G. genidens* e *G. planifrons* (Tabela 7).

A espécie *G. barbus* alocada no grupo 1, revelou valor de distância genética intraespecífica de 0,004 (Tabela 7), o menor valor de distância intraespecífica deste grupo foi observado entre as espécies *G. barbus* e *G. machadoi* com valor de 0,002, sendo o

maior valor de 0,005 entre as espécies *G. barbus* e *G. planifrons* (Tabela 7). Com base nestes valores, sugerimos que estas espécies pertencem, portanto, ao mesmo grupo, corroborando com os resultados apresentados na árvore de NJ, não foi possível discriminar.

O segundo grupo (Figura 10) foi constituído por indivíduos da espécie *G. genidens*, e não foram detectados conflitos taxonômicos entre as amostras deste estudo relacionado com as sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank*.

Na espécie *G. genidens* a distância intraespecífica foi de 0,004, e a interespecífica entre as sequências do *GenBank* de 0,002. O resultado de distância genética indica que estas linhagens são da mesma espécie de *G. genidens*. Quando relacionada as demais espécies do grupo em relação a espécie *G. genidens*, os índices interespecíficos observados na tabela variam de $0,024 \pm 0,026$, sugerindo serem espécies estruturadas taxonomicamente quando confrontadas com *G. genidens*.

Tabela 7. Análise da distância genética Kimura-2-parâmetros (K₂P) entre as espécies do gênero *Genidens* (abaixo da diagonal) e os erros padrão (acima da diagonal). Os números em negritos correspondem as distâncias genéticas intraespecíficas.

Espécies	1	2	3	4	5	6
1. <i>Genidens genidens</i> •	0,001	0,005	0,005	0,005	0,001	0,005
2. <i>G. barbus</i> •	0,025	0,004	0,002	0,001	0,004	0,001
3. <i>G. planifrons</i> *	0,026	0,005	n/c	0,001	0,004	0,001
4. <i>G. machadoi</i> *	0,025	0,002	0,002	n/c	0,003	0,001
5. <i>G. genidens</i> *	0,002	0,023	0,021	0,020	n/c	0,003
6. <i>G. barbus</i> *	0,024	0,003	0,003	0,001	0,019	n/c

•Sequências obtidas no presente estudo.

*Sequências utilizadas do artigo de Betancur – R et al. (2007), extraídas do *GenBank*.

7.2 SNPs

Um total de 1.099 SNPs foram obtidos para 51 indivíduos do gênero *Genidens* para a costa Sudeste e Sul do Brasil. As análises dos dados de sequenciamento resultaram em 16.590.489 *reads*, e após as etapas de filtragens de dados de NGS, 10.633.682 *reads* foram retidas.

7.2.1 Genômica populacional

A análise *pairwise* com base nos valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre as espécies *Genidens genidens* (n=27) e *G. barbus* (n=18) foi de 0,415 (*P-value* 0,0000±0,0000), entre as espécies *G. genidens* e *G. machadoi* (n=06) o valor de F_{ST} =0,547 (*P-value* 0,0000±0,0000), e entre as espécies *G. machadoi* e *G. barbus* o índice de F_{ST} = 0,052 (*P-value* 0,85081±0,0036) (Tabela 8). Estes resultados indicam que as espécies *G. genidens* e *G. barbus* são linhagens distintas, no entanto, *G. barbus* e *G. machadoi* pertencem a uma linhagem com baixa divergência genética.

Tabela 8. Valores de F_{ST} par-a-par das espécies do gênero *Genidens*. Os números destacados pela cor cinza indicam os valores de *P-value*.

Valores de F_{ST} par-a-par	1	2	3
1. <i>Genidens genidens</i>		0,00000±0,00000	0,0000±0,0000
2. <i>G. barbus</i>	0,415		0,85081±0,0036
3. <i>G. machadoi</i>	0,547	0,052	

As análises Bayesianas no STRUCTURE pelo método de Puechmaille indicaram o valor provável de K=2 (MaxMedk=2) (Figura 11), apresentando um *cluster* para a espécie *G. genidens* (verde), e o outro *cluster* (vermelho) em ambas as espécies *G. barbus* e *G. machadoi*. Os resultados do STRUCTURE corroboram os índices de F_{ST} entre as espécies, sugerindo duas linhagens para o gênero: *G. genidens* (n=27) e *G. barbus* (n=24) (Figura 11).

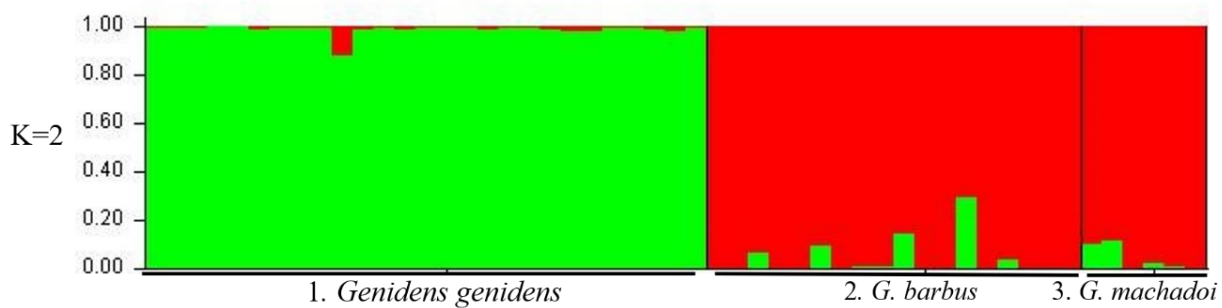


Figura 11. Bar plot do STRUcTURE sugerindo um valor de K=2 com 1.099 SNPs para os 51 indivíduos do gênero *Genidens* amostradas na costa Sudeste e Sul do Brasil.

A análise discriminante de componentes principais (DAPC) indicaram três agrupamentos genéticos: 1. *G. genidens* (vermelho), 2. *G. machadoi* (amarelo) e 3. *G. barbus* (azul) (Figura12). Observa-se que a espécie *G. genidens* forma um grupo genético distinto em relação aos demais, todavia, as espécies *G. machadoi* e *G. barbus* se sobrepõem, sugerindo que os indivíduos identificados como *G. machadoi* tem relação genética entre os indivíduos de *G. barbus*. Com base no gráfico, os resultados sugerem que *G. machadoi* está mais relacionado geneticamente com a espécie *G. barbus* (Figura 12), corroborando os resultados do STRUcTURE (Figura 11).

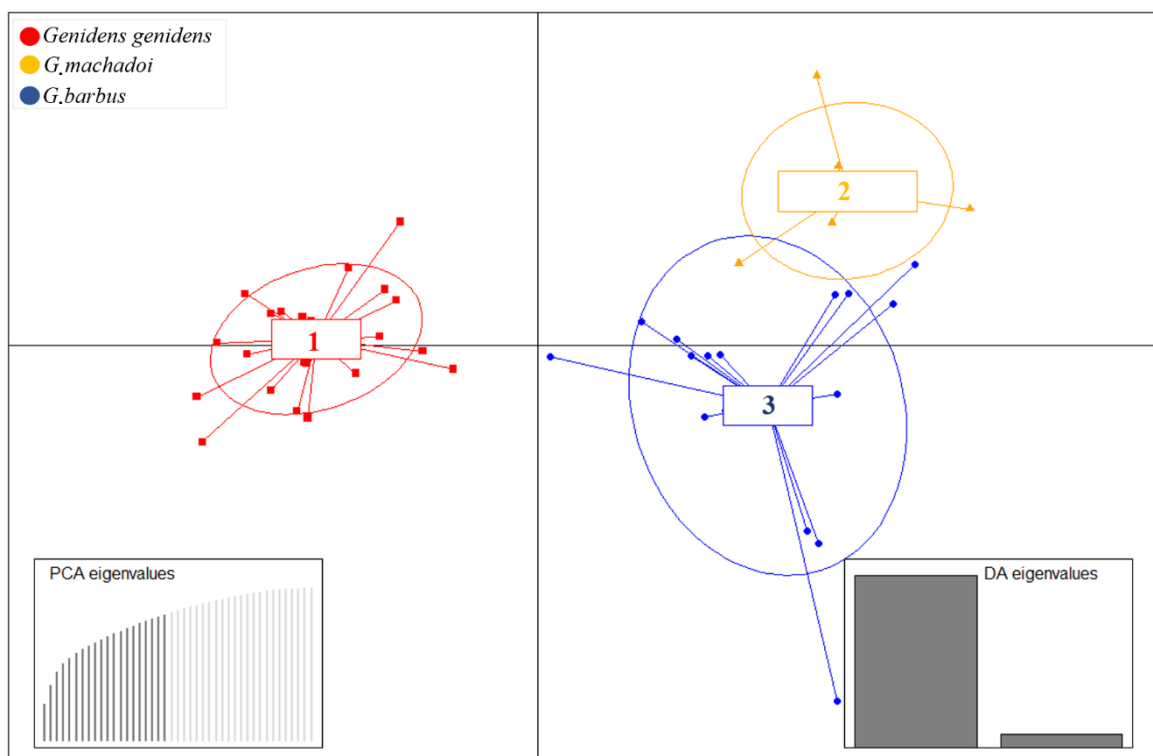


Figura 12. Análise de Discriminantes de Componentes Principais (DAPC) ilustrando a formação de três agrupamentos genéticos para o gênero *Genidens*, porém, pode ser observada uma sobreposição entre o agrupamento 2 e 3.

Uma investigação populacional mais detalhada foi realizada para cada espécie com o objetivo de compreender a dinâmica das populações dentro das espécies do gênero.

Na espécie *Genidens genidens* foram identificados 702 SNPs em 27 indivíduos amostrados na costa Sudeste (n=17) e Sul (n=10) do Brasil. As análises de diversidade genética identificaram para a costa Sudeste 107 alelos privados (A_p), com índices de heterozigosidade de $H_o=0,384$ e $H_e=0,260$. Na costa Sul foi identificado um valor de $A_p=97$, apresentando valores de $H_o=0,424$ e $H_e=0,144$. Os valores para ambas as localidades indicam excesso de heterozigotos. Os valores de índice de fixação ou coeficiente de endogamia (F_{IS}) para costa Sudeste foi de 0,178 e 0,110 para o Sul (Tabela 9), indicando ocorrência de endogamia em ambas regiões analisadas.

Tabela 9. Diversidade genética para as espécies do gênero *Genidens* para as regiões amostradas da costa do Brasil.

Espécies	Localidade	N	A_p	H_o	H_e	F_{IS}
<i>G. genidens</i>	Sudeste	17	107	0,384	0,260	0,178
	Sul	10	97	0,424	0,144	0,110
<i>G. barbus</i>	Sudeste	15	85	0,155	0,147	0,209
	Sul	09	22	0,135	0,202	0,174

N: Número de amostras, A_p : Número de alelos privados, H_o : Heterozigosidade observada, H_e : Heterozigosidade esperada, F_{IS} : Coeficiente de endogamia.

A análise de estruturação genética entre exemplares de *G. genidens* da costa Sudeste e Sul resultou no valor de $F_{ST}=0,058$ (P -value $0,03168\pm0,0017$), indicando uma estruturação genética inicial entre as regiões (Tabela 10).

Tabela 10. Índices de estruturação par-a-par de F_{ST} entre os indivíduos amostrados para cada espécie na costa Sudeste e Sul do Brasil. Os números destacados pela cor cinza indicam os valores de P -value.

F_{ST}	Região	Sudeste	Sul
<i>Genidens genidens</i>	Sudeste		0,03168±0,0017
	Sul	0,058	
<i>G. barbus</i>	Sudeste		0,29403±0,0047
	Sul	0,031	

As análises do STRUCTURE pelo método de Evanno, o valor de K mais provável foi de K=3 (Delta K=0,39070), indicando 3 *clusters* (Figura 13). O primeiro *cluster*

(vermelho) entre os indivíduos da costa Sudeste e Sul (ES; RJ; SP e SC), o segundo *cluster* (verde) apresentou um padrão semelhante ao primeiro *cluster*, somando a localidade do Rio Grande do Sul (RS) e o terceiro *cluster* (azul) apenas indivíduos de Santa Catarina (SC).

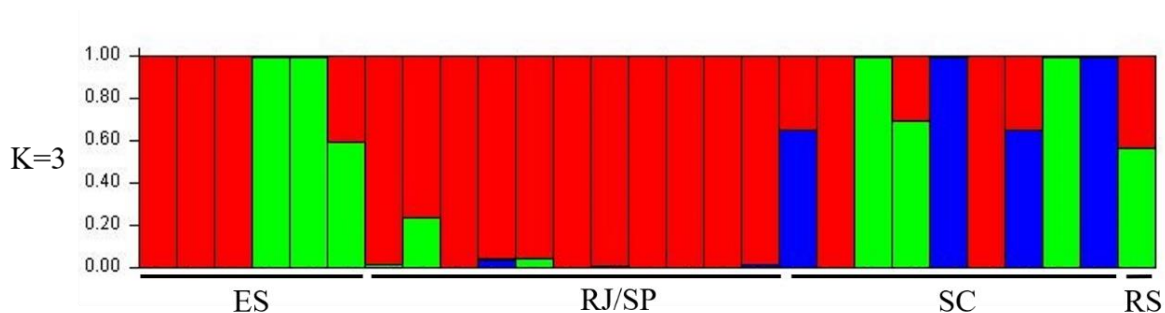


Figura 13. Bar plot do STRUCTURE estimada pela análise Bayesiana evidenciando valor de K=3 para os 27 indivíduos da espécie *Genidens genidens* e as localidades correspondentes a amostragem. **Legenda:** Cluster 1 (vermelho), cluster 2 (verde) e cluster 3 (azul). Localidades: Espírito Santo (ES); Rio de Janeiro (RJ); São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS).

A fim de compreender melhor a estruturação inicial detectada foi realizada a análise de F_{ST} entre os *clusters*. Entretanto, as análises par-a-par não revelaram estruturação populacional entre os cluster 1 e cluster 2 o valor de $F_{ST}=0,035$ (P -value $0,36769\pm0,0051$), entre o cluster 1 e 3 $F_{ST}=0,045$ (P -value $0,00525\pm0,0007$) e entre o cluster 2 e 3 $F_{ST}=0,001$ (P -value $0,05386\pm0,0025$) (Tabela 11).

Tabela 11. Índices de estruturação par-a-par de F_{ST} entre *clusters* em cada espécie do gênero *Genidens*. Os números referentes aos *clusters* estão marcados pelas cores indicados pelo STRUCTURE, e os números destacados pela cor cinza indicam os valores de P -value.

F_{ST}	Clusters	1	2	3
<i>Genidens genidens</i>	1		0,36769±0,0051	0,00525±0,0007
	2	0,035		0,05386±0,0025
	3	0,045	0,001	
<i>G. barbus</i>	Clusters	1	2	
	1		0,00020±0,001	
	2	0.330		

Entre os indivíduos da espécie *G. barbus* (n=24) foram utilizados 331 SNPs de indivíduos amostrados na costa Sudeste e Sul. Os índices de diversidade genética para a costa Sudeste (n=15) identificaram 85 Ap, com valores de $H_o=0,155$ e $H_e=0,147$ indicando excesso de heterozigotos e valor de $F_{IS}=0,209$, sugerindo indícios de endogamia. Na costa do Sul (n=9) o número de Ap=22, com valores de $H_o=0,135$ e $H_e=0,202$, e o índice de $F_{IS} = 0,174$ (Tabela 9), indicando um excesso de homozigotos.

O valor par-a-par de F_{ST} entre a costa Sudeste e Sul foi de 0,031 (P -value $0,29403\pm0,0047$) (Tabela 10), sugerindo ausência de estruturação. A análise de estruturação do STRUCTURE segundo o método de Evanno indicou um $K=2$ (Delta $K=96,76843$), resultando em dois *clusters*, um *cluster* (verde) para as localidades do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC), e o segundo *cluster* (vermelho) para três indivíduos do Rio Grande do Sul (RS).

Quando investigado o índice de F_{ST} entre os *clusters*, notavelmente indica estruturação genética ($0,330$, P -value $0,00020\pm0,001$), propondo que os indivíduos do segundo *cluster* podem corresponder a uma nova linhagem.

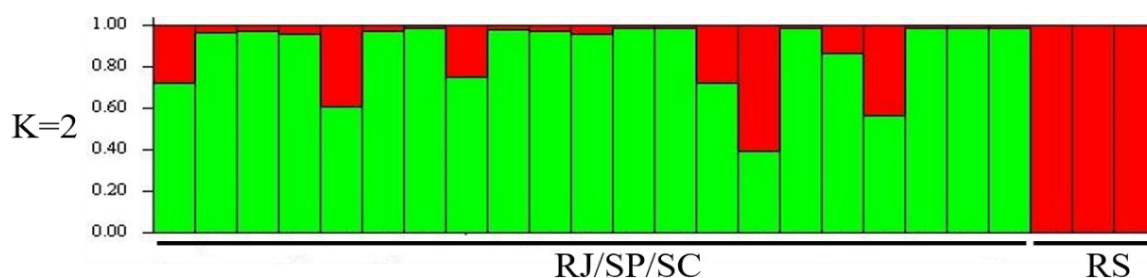


Figura 14. Resultados do STRUCTURE com valor de $K=2$, na espécie *Genidens barbus* e as respectivas áreas de amostragem.

8. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível identificar com mtDNA a espécie *Genidens genidens*, todavia, as demais espécies do gênero apresentaram conflitos taxonômicos (*G. barbatus*, *G. machadoi* e *G. planifrons*). As análises utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs indicaram estruturação genética com base nos valores de F_{ST} entre as espécies *G. barbatus* e *G. genidens*, no entanto, detectamos baixo valor de divergência entre as espécies *G. barbatus* e *G. machadoi*, sugerindo que ambas pertencem a mesma linhagem.

O gênero *Genidens* apresenta diversidade genética. A espécie *G. genidens* revelou presença inicial de estruturação populacional entre a costa Sudeste e Sul do Brasil, diferentemente do encontrado em indivíduos da espécie *G. barbatus*, que indicaram ausência de estruturação genética.

Identificação molecular das espécies do gênero Genidens

A árvore de NJ com base nos genes mitocondriais revelou dois grupos, um referente as sequências da espécie *G. genidens*, e o segundo grupo, com sequências dos exemplares identificados como espécies *G. barbatus*, *G. machadoi* e *G. planifrons*.

Resultados moleculares semelhantes ao deste estudo foram obtidos por Betancur-R. (2009) e Silva et al. (2010), que também não encontraram diferenças genéticas entre as espécies *G. barbatus*, *G. machadoi* e *G. planifrons*, a ausência de informações genéticas com o uso de marcadores mitocondriais e nucleares para identificação genética, também foram mencionadas no gênero *Cathorops*, sugerindo que a mesma hipótese pode ocorrer nas espécies em estudo de *Genidens*.

Em contra partida, os resultados de divergência genética com SNPs nas amostras do presente estudo indicaram valores significativos ($P\text{-value} > 0,05$) de F_{ST} e valor de $K=2$, os quais resultaram na identificação das espécies *G. genidens* e *G. barbatus* para a costa Sudeste e Sul do Brasil. Com base nestes dados podemos considerar que os marcadores genômicos são mais efetivos para discriminação das espécies do gênero, como já visto em alguns trabalhos anteriores com uso de SNPs em peixes (Behrens et al., 2021; Mérot et al., 2022).

A espécie *G. barbatus* reside preferencialmente em estuários e na plataforma continental, em até 40 metros de profundidade, do Sul da Bahia ao norte da Argentina. A espécie *G. machadoi* ocorre em regiões costeiras com profundidade de 80 metros na

plataforma continental, do norte do Rio de Janeiro ao estreito de Magalhães no Chile (Marceniuk, 2005). O valor de F_{ST} entre *G. barbus* e *G. machadoi* obtidos neste estudo mostra que são geneticamente similares, podendo pertencer a uma mesma linhagem.

Ambas as espécies *G. barbus* e *G. machadoi* são morfologicamente bem definidas com base nas variações do padrão das placas de dentes da região do palato com cerca de 46 caracteres morfológicos e plasticidade fenotípica relacionadas aos hábitos de vida (Marceniuk, 2005b). As análises genômicas do presente estudo propõem que a espécie *G. machadoi* esteja mais relacionada geneticamente a *G. barbus*, e isto pode estar relacionada aos diferentes ambientes podem estar resultando para a plasticidade fenotípica.

A segunda hipótese é a presença de uma linhagem molecular (*G. barbus*) em duas linhagens morfológicas que seriam de *G. barbus* e *G. machadoi* (Alexandre P. Marceniuk, comunicação pessoal). O presente estudo é inovador, pois é o primeiro com SNPs a sugerir ausência de divergência genética entre as espécies *G. barbus* e *G. machadoi*.

Diversidade Genética e estruturação populacional nas espécies do gênero Genidens

Na diversidade genética os valores máximos da heterozigosidade observada em *G. genidens* ($H_O=0,384$ a $0,424$) e *G. barbus* ($H_O=0,135$ a $0,155$), bem como a esperada ($H_E=0,144$ a $0,260$) e ($H_E=0,147$ a $0,222$), indicaram excesso de heterozigotos, exceto, para os indivíduos da localidade do Rio Grande do Sul (RS) de *G. barbus* que indicaram excesso de homozigotos. Quando comparados com espécies de peixes estuarinas e costeiras de *Collichthys lucidus* ($H_O=0,235$ a $0,414$ e $H_E=0,227$ a $0,348$; Zhao et al., 2021), *Sillago japonica* ($H_O=0,235$ a $0,414$ e $H_E=0,227$ a $0,348$; Yang et al., 2020) e *Solea solea* ($H_O=0,330$ a $0,360$ e $H_E=0,330$ a $0,350$; Diopere et al., 2018), foi observada uma diversidade genética relativamente similar em *G. genidens* e mais sutil em *G. barbus*, possivelmente pelo excesso de homozigotos presentes nos indivíduos do RS.

As espécies de bagres marinhos podem apresentar movimentos sazonais entre habitats heterogêneos com diferença na salinidade, relacionados a diferentes fases do ciclo de vida, como reprodução, alimentação e ontogenia (Schmidt et al., 2008; Avigliano et al., 2019a). Essas movimentações sazonais podem elevar a diversidade genética para algumas espécies, como também, gradientes de temperatura, salinidade e sedimentos (Yang et al., 2020; Sebastian et al., 2021; Zhao et al., 2021). Os valores de F_{IS} positivo

podem estar indicando o início de um processo de endogamia, embora haja presença de heterozigotos sugerindo a presença de variabilidade genética.

A espécie *G. genidens* apresenta uma estruturação genética inicial entre a costa Sudeste e Sul com base nos valores significativos de F_{ST} . A hipótese da presença inicial de estruturação seja que em períodos reprodutivos a espécie supostamente se afasta dos estuários e migra para as áreas costeiras (Barbieri et al., 1992; Hostim-Silva et al., 2009), outros autores (Maciel et al., 2018) sugerem ausência de migração, e total dependência de ambientes estuarinos para todos os ciclos de vida da espécie. Outros ainda indicam que a espécie reside em ambos os habitats relacionados ao ciclo de vida (Santos et al., 2016; Mendonça et al., 2020; Maciel et al., 2020). Sugerimos que a migração restrita da espécie pode estar associada ao hábito de vida resultando a uma estruturação inicial.

Em contra partida, a espécie *G. barbus* indicou uma conectividade entre as populações podendo estar associada ao fato de que os bagres marinhos na fase adulta realizam migrações reprodutivas na primavera para regiões de baixa salinidade (rios, lagoas costeiras ou estuários), após a desova das fêmeas em ambientes com baixa salinidade os machos retornam as águas estuarinas com ovos dentro da cavidade orofaríngea onde os juvenis são liberados (Avigliano et al., 2017).

Essa migração segundo Avigliano et al., (2017) é denominada de migração cíclica, como observado em bagres de *G. barbus*, que utiliza ambientes de água doce, estuarinos e marinhos com diferentes padrões migratórios que podem variar dependendo do estágio ontogenético. As mudanças no habitat com a migração cíclica remetem-se a sugestão da hipótese anterior para a conectividade das populações de *G. barbus*, e que as variações de salinidade em ambientes heterogêneos não reduzem o fluxo gênico entre as populações, podendo ser aplicada para melhor compressão da ausência de estruturação evidenciada nesta espécie.

A presença de estruturação genética de F_{ST} ($<0,25$) entre o *cluster* representado pelos três indivíduos amostrados do Rio Grande do Sul (RS) em relação aos demais da espécie *G. barbus* foi observado. A estruturação genética presente na espécie *G. barbus* pode estar indicando que o *cluster* relacionado a região do RS possivelmente seja uma terceira linhagem que esteja ocorrendo ao gênero.

Sugerimos que esta linhagem possa estar sendo representada pela espécie *G. planifrons* devido ao fato de ambas ocorrerem em simpatria, e a segunda espécie ser restrita ao Rio Grande do Sul (Marceniuk, 2005). Mais estudos serão realizados na espécie *G. planifrons* a fim de obter maiores informações.

Este conjunto de dados não foi observado anteriormente nas análises de gênero, pois para esta espécie foi elaborado um painel de SNPs que ocorriam apenas em *G. barbus*. Com base nisto foi possível notar esta estruturação genética. Futuramente, cabe realizar uma amostragem maior na localidade do RS a fim de obter maior clareza da hipótese da ocorrência da espécie *G. planifrons*.

A sobrepesca em espécies de bagres marinhos do Atlântico Sudoeste.

Dentre as espécies pescadas de Ariidae nos desembarques comerciais registradas na costa Sul do Brasil, *G. barbus* e *G. machadoi* são as mais comercializadas (Mendonça et al., 2020). Em contrapartida, mesmo que no século passado uma notável abundância de Ariidae tenha sido presenciada em desembarques ao longo da costa sudeste e sul do Brasil, o monitoramento da pesca de bagres marinhos mostra sinais de declínio nas espécies nos últimos anos (Velasco et al., 2007; Mendonça et al., 2020).

A espécie *G. barbus* e seus congêneres sofrem com sobrepesca, principalmente durante o período reprodutivo. De acordo com os dados coletados (Machado et al., 2020), a principal ocorrência de *G. barbus* nos desembarques é de outubro a dezembro, período que coincide com a época de desova da espécie (Reis, 1986, Baigún et al., 2012) tornando um ponto crítico, uma vez que as características biológicas dessas espécies como baixa fecundidade, crescimento lento e presença de cuidado parental por machos (Velasco & Oddone, 2004) implicam em cuidados para conservação.

Devido à ausência de estruturação genética da espécie *G. barbus* entre as localidades amostradas, é sugerido que a espécie seja panmítica, contudo, mesmo que estudos evidenciem a ocorrência de diferentes populações ao longo das áreas estuarinas da costa Sudeste (Mendonça et al., 2020).

Os dados aqui apresentados, não evidenciam estruturação, embora a espécie tenha apresentado sinais de declínio populacional pela ação da sobrepesca (Mendonça et al., 2020), e a demora para a recuperação populacional devido ao comportamento reprodutivo, maturação sexual tardia e grande longevidade desta espécie (até 30 anos) (Velasco et al., 2007). Contudo, é necessário que haja adaptações e monitoramento maior nas metodologias da prática pesqueira no período do defeso com objetivo de conservação das espécies.

9. CONSIDERAÇÕES

- A uma complexidade taxonômica que foi um pouco elucidada com SNPs;
- Este estudo fornece informações importantes relacionadas a genética de populações com SNPs, e evidência a necessidade da implementação das práticas de conservação dos ecossistemas estuarinos visto a importância desses ambientes, que são menos protegidos pelas áreas de proteção integral brasileiras (~0,2% das áreas estuarinas do país);
- Representam extrema importância biológica, principalmente para as espécies presentes nesse estudo, que dependem do bioma estuarino para completar seu ciclo de vida.

9. REFERÊNCIAS

- Able, K. W. (2005). A re-examination of fish estuarine dependence: Evidence for connectivity between estuarine and ocean habitats Estuarine. Coastal and Shelf Science, 64: 5-17. Doi: 0.1016/j.ecss.2005.02.002.
- Andrews, K. R, Good, J. M, Miller, M. R, Luikart, G, Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. Nature Reviews Genetics 17: 81– 92.
- Andrews S: FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. [WWW Document].2018.
- Aderne, A. F., de Araújo Bitencourt, J., Watanabe, L. A., Schneider, H., de Mello Affonso, P. R. A., & Sampaio, I. (2022). Allopatric divergence and secondary contact of two weak fish species (*Macrodon ancylodon* and *Macrodon atricauda*) from the South Atlantic. Fisheries Research, 245, 106126. Doi: 10.1016/j.fishres.2021.106126.
- Appleyard, S. A., Lynch, T. P., Green, M. A., & Encinas-Viso, F. (2021). Genetic diversity and restricted genetic connectivity in an endangered marine fish (*Brachionichthys hirsutus*) provides a model for conservation management in related and data-deficient species. Marine and Freshwater Research, 72(12), 1735-1745. Doi: 10.1071/MF21169.
- Avigliano, E., Leisen M, Romero R, Carvalho B, Velasco G, Vianna M, Barra F & Volpedo A. V. (2017). Fluvio-marine travelers from South America: Cyclic amphidromy and freshwater residency, typical behaviors in *Genidens barbus* inferred by otolith chemistry. Fish Res 193: 184-194. Doi: 10.1016/j.fishres.2017.04.011.
- Avigliano, E., Maichak de Carvalho, B., Leisen, M., et al., (2017c). Otolith edge fingerprints as approach for stock identification of *Genidens barbus*. Estuar. Coast. Shelf Sci. 194, 92–96. Doi: 10.1016/j.ecss.2017.06.008.

Avigliano, E., Carvalho, B. M., Miller, N., et al., (2019a). Fin spine chemistry as a non-lethal alternative to otoliths for stock discrimination in an endangered catfish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 614, 147–157. Doi: 10.3354/meps12895.

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A, et. al. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3: e3376. Doi: 10.1371/journal.pone.0003376.

Baigún, C. R. M., Colautti, D., López H. L., Van, D. P. A & Reis R. E. (2012b). Application of extinction risk and conservation criteria for assessing fish species in the lower La Plata River basin, South America. *Aquat Conserv* 22(2): 181-197. Doi: 10.1002/aqc.2223.

Barbieri, L. R.; Santos, R. P.; Andreatta, J. V. (1992). Reproductive biology of the marine catfish, *Genidens genidens* (Siluriformes, Ariidae), in the Jacarepagua Lagoon system, Rio de Janeiro, Brazil. *Env. Biol. Fish* 35, 23–35.

Barletta-Bergan, A., Barletta, M., Saint-Paul, U. (2005). Community structure and temporal variability of ichthyoplankton in North Brazilian mangrove creeks. *Journal of Fish Biology* 61 (Suppl. A):33-51. 2002a. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb01759.x

Barletta, M., A. Barletta-Bergan, U. Saint-Paul, and G. Hubold. (2003). Seasonal changes in density, biomass and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (Northern Brazilian Coast, East Amazon). *Marine Ecology Progress Series* 256: 217–228. Doi: 10.3354/meaps25217.

Barletta, M., A., Barletta-Bergan, U., Saint-Paul & G. Hubold. (2005). The role of salinity in structuring the fishing assemblages in a tropical estuary. *Journal of Fish Biology* 66: 1–28. Doi 10.1111/j.0022-1112.2005.00582.x.

Barletta, M., C. S., Amaral, M. F. M., Correa, F., Guebert, D.V. Dantas., L. Lorenzi & U. Saint-paul. (2008). Factors affecting seasonal variations in demersal fish assemblages at an ecocline in a tropical\subtropical estuary. *Journal of Fish Biology* 73: 1315-1336. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02005.x.

Baggio, R. A, Stoiev, S. B, Spach, H. L., Boeger, W. A. (2017). Opportunity and taxon pulse: the central influence of coastal geomorphology on genetic diversification and endemism of strict estuarine species. *J Biogeogr.* 44(7):1626-39. Doi: 10.1111/jbi.12934.

Baigún, C. R. M., Colautti, D., López, H. L., Van Damme, P. A. & Reis, R. E. (2012). Application of extinction risk and conservation criteria for assessing fish species in the lower La Plata River basin, South America. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 22(2), 181-197. Doi:10.1002/aqc.2223.

Blaber, S. J. (2008). *Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation and conservation*. John Wiley & Sons.

Beck, M. W., Heck K. L., Jr., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpern, B. S., Hays, C.G., Hoshino, K., Minello, T. J., Orth, R. J., Sheridan, P. F., Weinstein, M. P. (2003). The role of nearshore ecosystems as fish and shellfish nurseries. *Issues in Ecology*, 11: 2-12.

Begossi, A., Salivonchyk, S., Glamuzina, B., Alves-Pereira, A., Batista, C. E. D. A., & Priolli, R. H. (2021). Filling gaps: fishing, genetics, and conservation of groupers, especially the comb grouper (badejo) (*Mycteroperca acutirostris*), in SE Brazil (2013-2020). *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.04.12.439484.

Behrens, K. A., Girasek, Q. L., Sickler, A., Hyde, J., & Buonaccorsi, V. P. (2021). Regions of genetic divergence in depth-separated *Sebastes* rockfish species pairs: Depth as a potential driver of speciation. *Molecular Ecology*, 30(17), 4259-4275. Doi: 10.1111/mec.16046.

Benestan, L. M., Rougemont, Q., Senay, C., Normandeau, E., Parent, E., Rideout, R & Parent, G. J (2021). Population genomics and history of speciation reveal fishery management gaps in two related redfish species (*Sebastes mentella* and *Sebastes fasciatus*). *Evol. Appl.* 14, 588–606. Doi: 10.1111/eva.13143.

Betancur-R, R., Arturo, A., P, Bermingham, E, Cooke, R. (2007). Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from

mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. *Mol Phylogenet Evol* 45:339-357. Doi: 10.1016/j.ympev.2007.02.022.

Betancur-R, R & Armbruster, J. W. (2009). Molecular clocks provide new insights into the evolutionary history of Galeichthyine sea catfishes. *Evolution*, 63(5):1232-1243. Doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00640.x.

Betancur-R, R. (2009). Molecular phylogenetics and evolutionary history of ariid catfishes revisited: a comprehensive sampling. *BMC Evol. Biol.* 9, 175. Doi: 10.1186/1471-2148-9-175.

Betancur-R, R., A. Acero P., H. Duque-Caro & S. R. Santos. (2010). Phylogenetic and morphologic analyses of a coastal fish reveals a marine biogeographic break of terrestrial origin in the Southern Caribbean. *PLoS ONE*, 5: e11566(10p.). Doi: 10.1371/journal.pone.0011566.

Bolger, A. M., Lohse, M, Usadel B: Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–2120. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Buckley, S. J., Brauer, C., Unmack, P., Hammer, M. (2020). The roles of aridification and sea level changes in the diversification and persistence of freshwater fish lineages. Doi: 10.1101/2020.01.27.922427.

Brown, C. A., Holt, S. A., Jackson, G. A., Brooks, D. A., Holt, G. A. (2004). Simulating larval supply to estuarine nursery areas: how important are physical processes to the supply of larvae to the Aransas Pass Inlet? *Fish. Oceanogr.* 13, 181–196. Doi: 10.1111/j.1365-2419.2004.00285.x.

Brown, J. H., Lomolino, M. V. (2006). *Biogeography*. [S.1]: Sinauer Associates.

Bush, M. B., & Oliveira, P. E. (2006). The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotropica*, 6(1).

Cayuela, H., Rougemont, Q., Laporte, M., Mérot, C., Normandeau, E., Dorant, Y., ... & Bernatchez, L. (2019). Standing genetic variation and chromosomal rearrangements facilitate local adaptation in a marine fish. *bioRxiv*, 782201. Doi:10.1101/782201. 2019.

Caetano, A. R. (2009). Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 64-71.

Campos, M., Conn, J. E., Alonso, D. P., Vinetz, J. M., Emerson, K. J., Ribolla, P. E. (2017). Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasit Vectors*;10:76. Doi: 10.1186/s13071-017-2014-y.

Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W. A. (2013b.). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22 3124–3140. Doi: 10.1111/mec.12354.

Cortinhas, M. C. S., Kersanach, R. K., Proietti, M., Dumont, L. F. C., D'incao, F., Lacerda, A. L. F., Prata, P. S., Matoso, D. A., Noleto, R.N., Ramsdorf, W., Boni, T. A., PRIOLI, A. J. & Cestari, M. M. (2016). Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian Regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*,178,148.157. Doi: 10.1016/j.ecss.2016.06.007.

Cuvier, G. (1829). *Le Règne Animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée*. 2. ed. 532p.

Da Silva, R. P. L.V., Peloso, M. J., Sturaro, I., Veneza, I., Sampaio, H., Schneider, G. Gomes. (2018). Comparative analyses of species delimitation methods with molecular data in snappers (Perciformes: Lutjaninae) Mitochondrial. *DNA Part A*, 29 pp. 1108-1114. Doi: /10.1080/24701394.2017.1413364.

Dantas, D. V., Barletta, M.; Costa, M. F., Barbosa-Cintra, S. C. T., Possatto, F. E., Ramos, J. A. A., Lima, A. R. A., Saint-Paul, U. (2011). Movement patterns of catfishes (Ariidae)

in a tropical semiarid estuary. J. Fish Biol. 76, 2540–2557. 2011. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02646.x.

Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next – generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9 (5-60), 416-423.

Diopere, E., Vandamme, S. G., Hablützel, P. I., Cariani, A., Van Houdt, J., Rijnsdorp, A., ... & Maes, G. E. (2018). Seascape genetics of a flatfish reveals local selection under high levels of gene flow. *ICES Journal of Marine Science*, 75(2), 675-689. Doi: 10.1093/icesjms/fsx160.

Driller, M., Vilaca, S. T, Arantes, L. S., Carrasco-Valenzuela, T, Heeger, F., Chevallier D & Mazzon,i C. J. (2020). Optimization of ddRAD-like data leads to high quality sets of reduced representation single copy orthologs (R2SCOs) in a sea turtle multi-species analysis. *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2020.04.03.024331. I.

Earl, D. A. & Vonholdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–36–0.695. Doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Eigenmann, C. H. & Eigenmann, R. S. (1888). Preliminary notes on South American Nematognathi. I. *Proc. Calif. Acad. Sci. - Ser. 2*, 1: 119-172.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.

Excoffier L & Lischer H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Fahmi, Tibbetts, I. R., Bennett, M. B., Dudgeon, Christine L. (2021). Delimiting cryptic species within the brown-banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* in the Indo-

Australian region with mitochondrial DNA and genome-wide SNP approaches. BMC Ecol Evo 21, 121. Doi: 10.1186/s12862-021-01852-3.

Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, Evolution, 1985, vol. 39 (pg.783-791).

Fernández-Iriarte, P. J., M. P., Alonso, D. E., Sabadin, P. A., Arauz & C. M. (2011). Iudica. Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. Scientia Marina, 75: 701-706.

Freitas, S. A., DA, Silva. R., Sampaio, I., Schneider H. (2017). The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic Fish Res 191:87-94. Doi: 10.1016/j.fishres.2017.03.008.

Fricke, R., Eschmeyer, W.N., Fong, J.D. Eschmeyer's catalog of fishes: species by family/subfamily.
(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 01/02/2021. 2021.

Ganal, M. W., Altmann, T., Röder, M.S. (2009). SNP identification in crop plants. Current Opinion in Plant Biology, v.12, p.211-217.

Gkagkavouzis, K., Papakostas, S., Maroso, F., Karaïskou, N., Carr, A., Nielsen, E. E., & Triantafyllidis, A. (2021). Investigating Genetic Diversity and Genomic Signatures of Hatchery-Induced Evolution in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Populations. Diversity, 13(11), 563. Doi: 10.3390/d13110563.

Higuchi, H. (1982). Estudo osteológico de bagres marinhos do litoral sul do Brasil (Osteichthyes; Siluriformes, Ariidae). São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 135 p. (Dissertação de Mestrado).

Higuchi, H., Reis, E. G., Araújo, F. G. (1982). Uma nova espécie de bagre marinho do litoral do Rio Grande do Sul e considerações sobre o gênero nominal *Netuma* Bleeker, 1958 no Atlântico Sul Ocidental (Siluriformes, Ariidae). Atlântica, 5: 1-15.

Hostim-Silva M., Verani, J. R., Branco, J. O & Leite, J. R. (2009). Reprodução do bagre *Genidens genidens* (Siluriformes, Ariidae) na Foz do Rio Itajaí-Açú, SC, 227-248 p. In: Branco JO, Lunardon-Branco MJ and Bellotto VR (Org). Estuário do Rio Itajaí-Açú, Santa Catarina: caracterização ambiental e alterações antrópicas. Editora UNIVALI, Itajaí, SC, 312 p.

í Kongsstovu, S., Mikalsen, S. O., í Homrum, E., Jacobsen, J. A., Als, T. D., Gislason, H., & Dahl, H. A. (2022). Atlantic herring (*Clupea harengus*) population structure in the Northeast Atlantic Ocean. Fisheries Research, 249, 106231. Doi: 10.1016/j.fishres.2022.106231.

Jeffries, K. M., Connon, R. E., Verhille, C. E., Dabruzzi, T. F., Britton, M. T., Durbin-Johnson, B. P., Fangue, N. A. (2019). Divergent transcriptomic signatures in response to salinity exposure in two populations of an estuarine fish. Evol. Appl., 12, 1212-1226. Doi: 10.1111/eva.12799.

Jombart, T., Devillard, S & Balloux F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BMC genetics, 11(1), 94. Doi: 10.1186/1471-2156-11-94.

Jombart, T & Ahmed, I. (2011). Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. Bioinformatics, 27(21), 3070-3071.

Jordan, D. S. & Evermann, B. W. (1896) The fishes of North and Middle America: a descriptive catalogue of the species of fish-like vertebrates found in the waters of North America, north of the Isthmus of Panama. Part I. Bulletin of the U. S. National Museum, 47, i-lx + 1-1240.

Kailola P. J. (2004). A phylogenetic exploration of the catfish family Ariidae (Otophysi; Siluriformes). The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory. 20: 87±166.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., &

Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647- 1649. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.

Kjerfve, B., & Lacerda, L. D. (1993). Manguezais do Brasil (pp. 245–272). In: LD Lacerda (Coord.). *Conservação e utilização sustentável de florestas de mangue nas regiões da América Latina e África*. Okinawa, Japão: Sociedade Internacional para Ecossistemas de Mangue (ISME); Yokohama, Japão: Organização Internacional de Madeira Tropical (ITTO). (Relatórios técnicos de ecossistemas de mangue, v. 2).

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J Mol Evol*, 1980, vol. 16 (pg.111 - 120).

Lacepède, B. G. E. (1803). *Histoire naturelle des poissons*. 803p., pls. 1-21.

Leone, A., Álvarez, P., García, D., Saborido-Rey, F., & Rodriguez-Ezpeleta, N. (2019). Genome-wide SNP based population structure in European hake reveals the need for harmonizing biological and management units. *ICES Journal of Marine Science*, 76(7), 2260-2266. Doi:10.1093/icesjms/fsz161.

Li, Yu-Long & Liu Jin-Xian. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular ecology resources*, v. 18, n. 1, p. 176-177. Doi: 10.1111/1755-0998.12719.

Luikart, G., England, P., Tallmon, D. et al. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* 4, 981-994. Doi: 10.1038/nrg1226.

Ludt, W. B. & L. A. Rocha. (2015). Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42: 25-38. Doi: 10.1111/jbi.12416.

Maciel, T. R., Avigliano, E., de Carvalho, B. M., Miller, N., & Vianna, M. (2020). Population structure and habitat connectivity of *Genidens genidens* (Siluriformes) in tropical and subtropical coasts from Southwestern Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 242, 106839. Doi: 10.1016/j.ecss.2020.106839.

Machado, R.; Ott, P. H., Sucunza, F., Marceniuk, A. P. (2012). Ocorrência do bagre marinho *Genidens machadoi* (Siluriformes, Ariidae) na laguna Tramandaí, sul do Brasil. *Neotropical Biology and Conservation*, v.7, n. 3, p. 214- 219. Doi: 10.4013/nbc.2012.73.08.

Machado, R. C., Silva, M. C. C., Proietti M. C, Haimovici, M. (2020). Genetic connectivity of black drum (*Pogonias courbina*) stocks in the southwestern Atlantic Ocean. *Environ Biol Fish* 103:913–926. Doi: 10.1007/s10641-020-00993-6.

MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets
Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016). *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Maciel, T. R., Vaz-dos-Santos, A. M., & Vianna, M. (2018). Can otoliths of *Genidens genidens* (Cuvier 1829) (Siluriformes: Ariidae) reveal differences in life strategies of males and females?. *Environmental Biology of Fishes*, 101(11), 1589-1598. Doi: /10.1590/1982-0224-20180101.

Marceniuk, A. P & Ferraris J. R. C. J. (2003). Family Ariidae (sea catfishes). In: Reis, R.E.; Ferraris Jr., C.J. & Kullander, S.E. (Eds.). *Checklist of the freshwater fishes of south and central América*. Edipucrs, Porto Alegre, p.447-455.

Marceniuk, A. P. (2005). Redescritção de *Genidens barbatus* (Lacépède, 1803) e *Genidens machadoi* (Miranda-Ribeiro, 1918), bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) do Atlântico sul ocidental. *Papéis avulsos de Zoologia*, 45(11), 111-125.

Marceniuk, A. P. (2005a). Chave de identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. *B Int Pesca* 31: 89-101.

Marceniuk, A. P. (2005b). Redescrição de *Genidens barbus* (Lacépède, 1803) e *Genidens machadoi* (Miranda-Ribeiro, 1918), bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) do Atlântico Sul Ocidental. Papéis Avulsos de Zoologia, 45(11):111-125.

Marceniuk, A. P. & MENEZES, N. A. (2007). Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. Zootaxa 1416:1-126.

Marceniuk, A. P. & Betancur-R, R. (2008). Revision of the species of the genus *Cathorops* (Siluriformes: Ariidae) from Mesoamerica and the Central American Caribbean, with description of three new species. Neotropical Ichthyology, 6, 25–44.

Marceniuk, A. P., Betancur-R, R., & Acero, A. (2009). Description of a new species of *Cathorops* (Siluriformes; Ariidae) from El Salvador, with redescription of four species of the genus from North and Central American Pacific. Bulletin of Marine Science, 85(3), 245-280.

Marceniuk, A. P., Hilsdorf, A. W. D. S., & Langeani, F. (2011). The ichthyofauna from the headwaters of the rio Tietê, São Paulo, Brazil. Biota Neotropica, 11(3), 217-236.

Marceniuk, A. P., Menezes, N. A., & Britto, M. R. (2012). Phylogenetic analysis of the family Ariidae (Ostariophysi: Siluriformes), with a hypothesis on the monophyly and relationships of the genera. Zoological Journal of the Linnean Society, 165(3), 534-669. Doi: 10.1111/j.1096-3642.2012.00822.x.

Marceniuk, A. P., Siccha-Ramirez R, Barthem, R. B., Wosiacki, W. B. (2017). Redescription of *Notarius grandicassis* and *Notarius parmocassis* (Siluriformes; Ariidae), with insights into morphological plasticity and evidence of incipient speciation. Syst Biodivers. 15(3):274-89. Doi: 10.1080/14772000.2016.1256916.

Marceniuk, A. P., Burlamaqui, T. C. T, Oliveira, C., Carneiro, J, Eleres, B., Sales, J. B. L. (2019a). Incipient speciation, driven by distinct environmental conditions, in the marine catfishes of the genus *Aspistor* (Siluriformes, Ariidae), from the Atlantic coast of South America. J Zool Syst Evol Res. 57:1-18. Doi/full/10.1111/jzs.12261.

Marceniuk, A. P., Ingenito, L. F. D. S., Lima, F. C. T., Gasparini, J. L. R., & Oliveira, C. (2019b). Systematics, biogeography and conservation of *Paragenidens grandoculis* n. gen. and n. comb. (Siluriformes; Ariidae), a critically endangered species from southeastern Brazil. *Zootaxa*, 4586(3), 425-444. Doi: 10.11646/zootaxa.4586.3.2.

Marceniuk, A. P., Oliveira, C., Sales, J. B. L., & Betancur-R, R. (2022). The marine catfishes of the genus *Bagre* (Siluriformes; Ariidae) from the Western Atlantic. *Marine Biodiversity*, 52(1), 1-18. Doi:10.1007/s12526-021-01238-0.

Mendonça, J. T., Balanin, S., & Garrone-Neto, D. (2020). The marine catfish *Genidens barbatus* (Ariidae) fisheries in the state of São Paulo, southeastern Brazil: diagnosis and management suggestions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92. Doi: 10.1590/0001-3765202020180450.

Mérot, C., Stenløkk, K. S., Venney, C., Laporte, M., Moser, M., Normandeau, E., ... & Bernatchez, L. (2022). Genome assembly, structural variants, and genetic differentiation between Lake Whitefish young species pairs (*Coregonus* sp.) with long and short *reads*. *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2022.01.15.476463.

Miller, M. R., Atwood, T. S., Eames, B. F., Eberhart, J. K., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H et al. (2007). RAD marker microarrays enable rapid mapping of zebrafish mutations. *Genome Biology* 8: R105. Doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r105.

Miranda-Ribeiro, A. (1918). Nova chave para a determinação das espécies do gênero *Tachysurus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciências*, 2: 108-111.

Morin, P. A., Matien, K. K., Taylor, B. L. (2009). Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources*, 9 (1) 66-73. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02392.x.

Nelson, J. S, Grande, T. C; Wilson, M.V.H. (2016). *Fish of the World*., Hoboken, John Willey & Sons Inc, New Jersey, Fourth, 5th ed.

Neves, J. M. M., Nolen, Z. J., Fabré, N. N., Pereira, Ricardo J. (2021). Genomic methods reveal independent demographic histories despite strong morphological conservatism in fish species. *Heredity* 127, 323–333. Doi: 10.1038/s41437-021-00455-4.

Olave, M., & Meyer, A. (2020). Implementing large genomic single nucleotide polymorphism data sets in phylogenetic network reconstructions: a case study of particularly rapid radiations of cichlid fish. *Systematic Biology*, 69(5), 848-862. Doi: 10.1093/sysbio/syaa005.

Paris, J. R., Stevens, J. R & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360-1373. Doi: 10.1111/2041-210X.12775.

Pedraza-Marrón, C. D. R., Silva, R., Deeds, J., Van Belleghem, S. M., Mastretta-Yanes, A., Domínguez-Domínguez, O., ... & Betancur-R, R. (2019). Genomics overrules mitochondrial DNA, siding with morphology on a controversial case of species delimitation. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1900), 20182924. Doi: 10.1098/rspb.2018.2924.

Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher, H. E. Hoekstra. (2017). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One*, 7 (2012), p. e37135. Doi:10.1371/journal.pone.0037135.

Pinheiro, H. T., Rocha, L. A., Macieira, R. M., Carvalho-Filho, A., Anderson, A. B., Bender, M. G., et al. (2018). South-western Atlantic reef fishes: zoogeographical patterns and ecological drivers reveal a secondary biodiversity centre in the Atlantic Ocean. *Divers. Distrib.* 24, 951-965. Doi: 10.1111/ddi.12729.

Pio, N., & Carvalho, T. (2021). Evidence on the paleodrainage connectivity during Pleistocene: Phylogeography of a hypoptopomatine endemic to southeastern Brazilian coastal drainages. *Neotropical Ichthyology*, 19, e200128. Doi: 10.1590/1982-0224-2020-0118.

Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J. L. (2012). Development of High-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *Plos one*, 7(2), e32253. Doi: 10.1371/journal.pone.0032253.

Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular ecology resources*, 16(3), 608-627. Doi: doi.org/10.1111/1755-0998.12512.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

Reis, E. G. (1986). Reproduction and feeding habitats of the marine catfish *Netuma barba* (Siluriformes, Ariidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, Brazil. *Atlântica* 8: 35-55.

Rousset F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106. Doi: doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.

Sebastian, W., Sukumaran, S., Abdul Azeez, S., Muraleedharan, K. R., Dinesh Kumar, P. K., Zacharia, P. U., & Gopalakrishnan, A. (2021). Genomic investigations provide insights into the mechanisms of resilience to heterogeneous habitats of the Indian Ocean in a pelagic fish. *Scientific reports*, 11(1), 1-16. Doi: 10.1038/s41598-021-00129-5.

Sprechmann, P. (1978). The paleoecology and paleogeography of the Uruguayan coastal area during the Neogene and Quaternary. *Zitteliana*, 4: 3-72.

Rimmer, M. A. (1985). Early development and buccal incubation in the fork-tailed catfish *Arius graeffei* Kner & Steindachner (Pisces: Ariidae) from the Clarence River, New South Wales. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 36, 405-411.

Rossi-Wongtshchowski, C. L. D. B., Valentin, J. L., Jablonski, S., Amaral, A. C., Hazin, F. H., & El-Robrini, M. (2006). Capítulo 1. Ambiente marinho. In Programa REVIZEE.

Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva (pp. 21–78). Relatório Executivo. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Santos, F. L. D. B. D. (2001). Levantamento da ictiofauna do estuário Rio Formoso através da pesca da camboa-Pernambuco. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 78p. 2001.

Saha, A., Kent, M., Hauser, L., Drinan, D. P., Nielsen, E. E., Westgaard, J. I., ... & Johansen, T. (2021). Hierarchical genetic structure in an evolving species complex: Insights from genome wide ddRAD data in *Sebastes mentella*. PloS one, 16(5), e0251976. Doi: /10.1371/journal.pone.0251976.

Schmidt, T. C. S., Martins, I. A., Reigada, A. L. D., Dias, J. F. (2008). Taxocenose de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da região estuarina de São Vicente, SP, Brasil. Biota Neotropica 8, 73-81. Doi: 10.1590/S1676-06032008000400006.

Schaeffer-Novelli, Y., Coelho-Junior, C.; Tognella-De-Rosa, M. (2001). Manguezais. Editora Gráfica Bernardi Ltda. São Paulo, p. 03-04.

Silva, C. C. F, Hilsdorf, A. W. S & Marceuniuk A. P. (2010). Caracterização molecular das espécies do gênero *Genidens*, (Siluriformes, Ariidae), bagres marinhos do sudeste-sul da América do Sul. XIII Congresso de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UMC).

Silva-Junior, D. R., Carvalho, D. M. T., Vianna, M. (2013). The catfish *Genidens genidens* (Cuvier, 1829) as a potential sentinel species in Brazilian estuarine waters. J. Appl. Ichthyol. 29, 1297-1303. Doi: /10.1111/jai.12280.

Silva-Junior, O. B., Faria, D. A., Grattapaglia, D. (2015). A flexible multi-species genome-wide 60K SNP chip developed from pooled resequencing of 240 Eucalyptus tree genomes across 12 species. New Phytologist, London, v. 206, n. 4, p. 1527-1540, June 2015. Doi: 10.1111/nph.13322.

Silva, W. C., Marceuniuk A. P, Sales, J. B. L, Araripe, J. (2016). Early Pleistocene lineages of *Bagre bagre* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of South

America, with insights into the demography and biogeography of the species. *Neotrop Ichthyol* [serial on the Internet]. 14(2):e150184. Doi:10.1590/1982-0224-20150184.

Silva, J. D., Barletta, M., Lima, A. R., & Ferreira, G. V. (2018). Use of resources and microplastic contamination throughout the life cycle of grunts (Haemulidae) in a tropical estuary. *Environmental Pollution*, 242, 1010-1021. Doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.038.

Spix, J. B. von & Agassiz, L. 1829-3. Selecta genera. et species piscium quos in itinere per Brasiliam anos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu. et auspiciis Maximiliani Josephi I. colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix Monachii. *Selecta Piscium Brasiliam*: Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, pls. 1-48; Part 2:83-138, pls. 49-101.

Stapley, J., Reger J., Feulner, P. G. D., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison C, Ball, A. D., Beckerman, A. P, Slate, J. (2010). Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(12):705-712. Doi: 10.1016/j.tree.2010.09.002.

Stamatakis, A., (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 1312–131. Doi:10.1093/bioinformatics/btu033.

Stange, M., Sánchez-Villagra, M. R., Salzburger, W & Matschiner, M. (2018). Bayesian divergence-time estimation with genome-wide SNP data of sea catfishes (Ariidae) supports miocene closure of the Panamanian isthmus. *Systematic Biology*, 67, 681-699. Doi: 10.5167/uzh-147496.

Stepien, C. A., R. H. Rosenblatt & B. A. Bargmeyer. (2001). Phylogeography of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*: divergence of Gulf of California and Pacific coast populations. *Evolution*, 55: 1852-1862. Doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00834.x.

Thomaz., A. T., Knowles., L. L. (2020). Common barriers, but temporal dissonance: Genomic tests suggest ecological and paleo-landscape sieves structure a coastal riverine fish community. *Mol. Ecol.*, 29. pp. 783-796. Doi: 10.1111/mec.15357.2020.

Unmack, P. J., Adams, M., Hammer, M. P., Johnson, J. B., Gruber, B., Gilles, A & Georges, A. (2022). Plotting for change: an analytical framework to aid decisions on which lineages are candidate species in phylogenomic species discovery. *Biological Journal of the Linnean Society*, 135(1), 117-137. Doi: 10.1093/biolinnean/blab095.

Velasco, G & Oddone M. C. (2004). Growth parameters and growth performance indexes for some populations of marine catfishes (Actinopterygii, Siluriformes, Ariidae). *Acta Biol Leopold* 26(2): 307-313.

Velasco, G., Reis, E. G & Vieira, J. P. (2007). Calculating growth parameters of *Genidens barbatus* (Siluriformes, Ariidae) using length composition and age data. *Appl Ichthyol* 23: 64-69. Doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00793.x.

Vendel, A. L. & P. T. C. Chaves. (2001). Baía de Guaratuba, Paraná: um estudo de caso sobre ictiofauna em estuários. p. 92 – 101. In: CHAVES, P. T. C. & VENDEL, A. L. *Reunião Técnica sobre ictiologia em estuários*. Curitiba. 101p.

Vilar, C. C., Joyeux, J. C., & Spach, H. L. (2017). Geographic variation in species richness, rarity, and the selection of areas for conservation: An integrative approach with Brazilian estuarine fishes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 196, 134-140. Doi: 10.1016/j.ecss.2017.06.022.

Weir, B. S, Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wright, S. (1978). *Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, 465 pp.

Yamahira, K., Mokodongan, D. F., Konishi, M., Mandagi, I. F., Masengi, K. W., Lawelle, S. A., ... & Inomata, N. (2022). Discovery of a genetically distinct lineage in medaka species within Lake Towuti in central Sulawesi. *Ichthyological Research*, 1-5. Doi: 10.1007/s10228-021-00856-9.

Yang, T. Y., Gao, T. X., Meng, W., & Jiang, Y. L. (2020). Genome-wide population structure and genetic diversity of Japanese whiting (*Sillago japonica*) inferred from genotyping-by-sequencing (GBS): Implications for fisheries management. *Fisheries Research*, 225, 105501. Doi: 10.1016/j.fishres.2020.105501.

Zhao, L., Qu, F., Song, N., Han, Z., Gao, T., & Zhang, Z. (2021). Population Genomics Provides Insights into the Population Structure and Climate-driven Adaptation of *Collichthys lucidus*. Doi: 10.21203/rs.3.rs-151802/v1.

10. SUPLEMENTAR

S1. Relação da espécie em estudo do gênero *Cathorops* e *Genidens* de acordo com sua classificação taxonômica e áreas amostradas.

Gênero <i>Cathorops</i>		
Amostras	Espécie	Localidade
96484	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA
80112	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA
96487	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA
80111	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA
80110	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA
98814	<i>Cathorops agassizii</i>	Soure - PA
83591	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
96478	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
96481	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
96479	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
96481	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
96482	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA
85813	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE
85812	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE
85811	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE
85814	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE
85761	<i>Cathorops agassizii</i>	Canárias - PI
85762	<i>Cathorops agassizii</i>	Canárias - PI
84895	<i>Cathorops agassizii</i>	Barra de Santo Antônio - AL
80118	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL
80119	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL
80120	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL
82002	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
96474	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
83590	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
96475	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
96476	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
82001	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
96477	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
82005	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
82004	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
83589	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
83588	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
82003	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA

Continuação

Amostras	Espécie	Localidade
98839	<i>Cathorops agassizii</i>	Soure - PA
82003	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA
80101	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE
80102	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE
80103	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE
S6	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE
S5	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE
S4	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE
80105	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE
96916	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96922	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96925	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96920	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96919	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96915	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96924	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96918	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
90128	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96923	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96926	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
96917	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA
90591	<i>Cathorops</i> sp.	Anchieta - ES
82457	<i>Cathorops</i> sp.	Rio de Janeiro - RJ
80053	<i>Cathorops</i> sp.	Rio de Janeiro - RJ
82458	<i>Cathorops</i> sp.	Rio de Janeiro - RJ
40605	<i>Cathorops</i> sp.	Bertioga - SP
86518	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP
86516	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP
86517	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP
X3	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP
21088	<i>Cathorops</i> sp.	Ubatuba - SP
51377	<i>Cathorops</i> sp.	Cananéia - SP
51376	<i>Cathorops</i> sp.	Cananéia - SP
86520	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP

Continuação

Gênero <i>Genidens</i>		
Amostras	Espécie	Localidade
06	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
58	<i>Genidens genidens</i>	Tramandaí - RS
05	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
18	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
03	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
10	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
08	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
21	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
04	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
09	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC
40604	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP
18770	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP
18769	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP
93786	<i>Genidens genidens</i>	Peruíbe - SP
86539	<i>Genidens genidens</i>	Santos - SP
86540	<i>Genidens genidens</i>	Santos - SP
82524	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro - RJ
82528	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro - RJ
82525	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro - RJ
82526	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro - RJ
82527	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro - RJ
91343	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
98962	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
98963	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
98958	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
98961	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
98964	<i>Genidens genidens</i>	Linhares - ES
57	<i>Genidens barbatus</i>	Tramandaí Imbé - RS
59	<i>Genidens barbatus</i>	Tramandaí Imbé - RS
61	<i>Genidens barbatus</i>	Tramandaí Imbé - RS
02	<i>Genidens barbatus</i>	Laguna - SC
73313	<i>Genidens barbatus</i>	Balneário Camburío - SC
87309	<i>Genidens barbatus</i>	Santa Catarina - SC
86193	<i>Genidens barbatus</i>	Zimbros - Bombinha - SC
01	<i>Genidens barbatus</i>	Laguna - SC
86142	<i>Genidens barbatus</i>	Balneário Camburío - SC
18768	<i>Genidens barbatus</i>	Ubatuba - SP
48674	<i>Genidens barbatus</i>	Macaé - RJ
96546	<i>Genidens barbatus</i>	São Vicente - SP

Continuação

Amostras	Espécie	Localidade
96547	<i>Genidens barbus</i>	São Vicente - SP
51374	<i>Genidens barbus</i>	Cananéia - SP
96545	<i>Genidens barbus</i>	São Vicente - SP
82577	<i>Genidens barbus</i>	Rio de Janeiro - RJ
82578	<i>Genidens barbus</i>	Rio de Janeiro - RJ
82579	<i>Genidens barbus</i>	Rio de Janeiro - RJ
01	<i>Genidens barbus</i>	Santos - SP
02	<i>Genidens barbus</i>	Santos - SP
05	<i>Genidens barbus</i>	Santos - SP
85044	<i>Genidens barbus</i>	Itanhaém - SP
90863	<i>Genidens barbus</i>	Itanhaém - SP
91944	<i>Genidens barbus</i>	Mongaguá - SP

S2. Sumário do sequenciamento *ddRAD* e processamento das sequências dos indivíduos do gênero *Cathorops* da costa do Brasil.

Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	142 pb
S6	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE	1.944.659	1.943.142	1.586.584	1.541.229
96478	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA	1.907.317	1.905.758	1.589.062	1.545.247
96916	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.895.223	1.893.792	1.576.931	1.533.789
96922	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.643.348	1.642.055	1.378.443	1.341.448
96925	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.616.438	1.615.187	1.349.503	1.313.767
82002	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	1.494.002	1.492.951	1.208.459	1.174.748
40605	<i>Cathorops</i> sp.	Bertioga - SP	1.472.378	1.471.300	1.214.888	1.181.276
96474	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	1.424.944	1.423.859	1.190.249	1.158.029
96920	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.323.713	1.322.659	1.108.284	1.078.763
80101	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE	1.321.058	1.320.077	1.106.372	1.076.532
83590	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	1.303.571	1.302.507	1.066.025	1.037.672
96475	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	1.276.311	1.275.367	1.056.805	1.029.122
96476	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	1.182.300	1.181.374	992.635	966.612
80102	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE	1.155.129	1.154.197	961.552	934.779
96919	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.126.171	1.125.315	940.795	915.350
82001	<i>Cathorops</i> sp.	Bragança - PA	1.115.912	1.115.083	925.880	900.666
86518	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP	1.112.210	1.111.463	918.029	892.056
96915	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.098.629	1.097.802	921.906	897.197
96924	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	1.092.383	1.091.527	908.932	884.431
96477	<i>Cathorops</i> sp.	Bragança - PA	1.002.006	1.001.218	832.184	810.446
96918	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	981.945	981.139	804.363	781.416
21088	<i>Cathorops</i> sp.	Ubatuba - SP	947.984	947.268	789.537	767.939
82457	<i>Cathorops</i> sp.	Rio de Janeiro - RJ	940.924	940.213	514.077	499.502

Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	142 pb
86516	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP	902.171	901.493	749.209	728.454
80053	<i>Cathorops</i> sp.	Rio de Janeiro - RJ	901.272	900.598	746.612	725.622
96481	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA	881.031	880.291	708.317	687.572
82005	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	861.805	861.149	715.203	696.224
80103	<i>Cathorops</i> sp.	Fortaleza - CE	832.495	831.808	695.010	675.989
83589	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	809.350	808.710	483.519	470.615
X3	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP	801.891	801.305	667.519	64.952
90128	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	796.606	795.958	670.960	653.239
82004	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	763.943	763.458	627.635	610.760
96479	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA	726.703	726.121	602.967	586.083
51376	<i>Cathorops</i> sp.	Cananéia - SP	707.198	706.736	556.717	541.050
96923	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	697.541	697.083	579.137	563.028
84895	<i>Cathorops agassizii</i>	Barra de Santo Antônio - AL	682.399	674.090	598.093	413.896
51377	<i>Cathorops</i> sp.	Cananéia - SP	628.241	627.725	529.507	515.450
86517	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP	609.616	609.140	507.659	493.443
83591	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA	483.138	482.756	404.588	393.704
82003	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	480.401	475.243	421.469	256.579
S5	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE	445.941	445.570	365.631	355.612
80112	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	441.008	435.399	387.817	271.925
96484	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	430.876	425.272	377.112	273.613
80118	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL	367.322	363.525	323.685	222.029
83588	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	344.423	344.159	286.859	279.077
85813	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE	338.858	335.290	299.503	200.412

Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	142 pb
96926	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	325.611	325.353	270.322	262.750
98839	<i>Cathorops agassizii</i>	Soure - PA	312.516	308.795	275.474	190.192
83587	<i>Cathorops arenatus</i>	Bragança - PA	312.216	309.489	275.751	191.361
80120	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL	306.866	302.694	265.420	178.184
85812	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE	306.529	303.334	270.345	182.142
85762	<i>Cathorops agassizii</i>	Canárias - PI	288.596	285.645	253.755	171.647
96487	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	286.997	283.439	251.615	176.363
80111	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	277.957	274.569	244.433	164.862
85811	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE	276.350	273.699	243.877	166.312
80110	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	256.100	252.791	224.291	156.130
80119	<i>Cathorops agassizii</i>	Maceió - AL	252.157	248.845	217.371	151.243
90591	<i>Cathorops</i> sp.	Anchieta - ES	251.970	249.740	220.000	166.875
85814	<i>Cathorops agassizii</i>	Chaval - CE	238.632	236.404	211.743	143.633
85761	<i>Cathorops agassizii</i>	Canárias - PI	234.643	230.921	201.804	144.331
82458	<i>Cathorops spixii</i>	Rio de Janeiro - RJ	210.396	210.179	121.916	117.405
98814	<i>Cathorops agassizii</i>	Soure - PA	209.238	205.618	175.829	135.184
96482	<i>Cathorops spixii</i>	Bragança - PA	168.299	168.162	137.573	133.550
82010	<i>Cathorops agassizii</i>	Bragança - PA	162.905	161.020	145.237	113.106
S4	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE	158.451	158.334	130.244	126.511
80105	<i>Cathorops</i> sp.	Aracajú - SE	146.397	146.294	120.747	117.386
86520	<i>Cathorops</i> sp.	Peruíbe - SP	118.975	118.892	98.516	95.566
96917	<i>Cathorops</i> sp.	Valença - BA	116.906	116.804	96.243	93.497

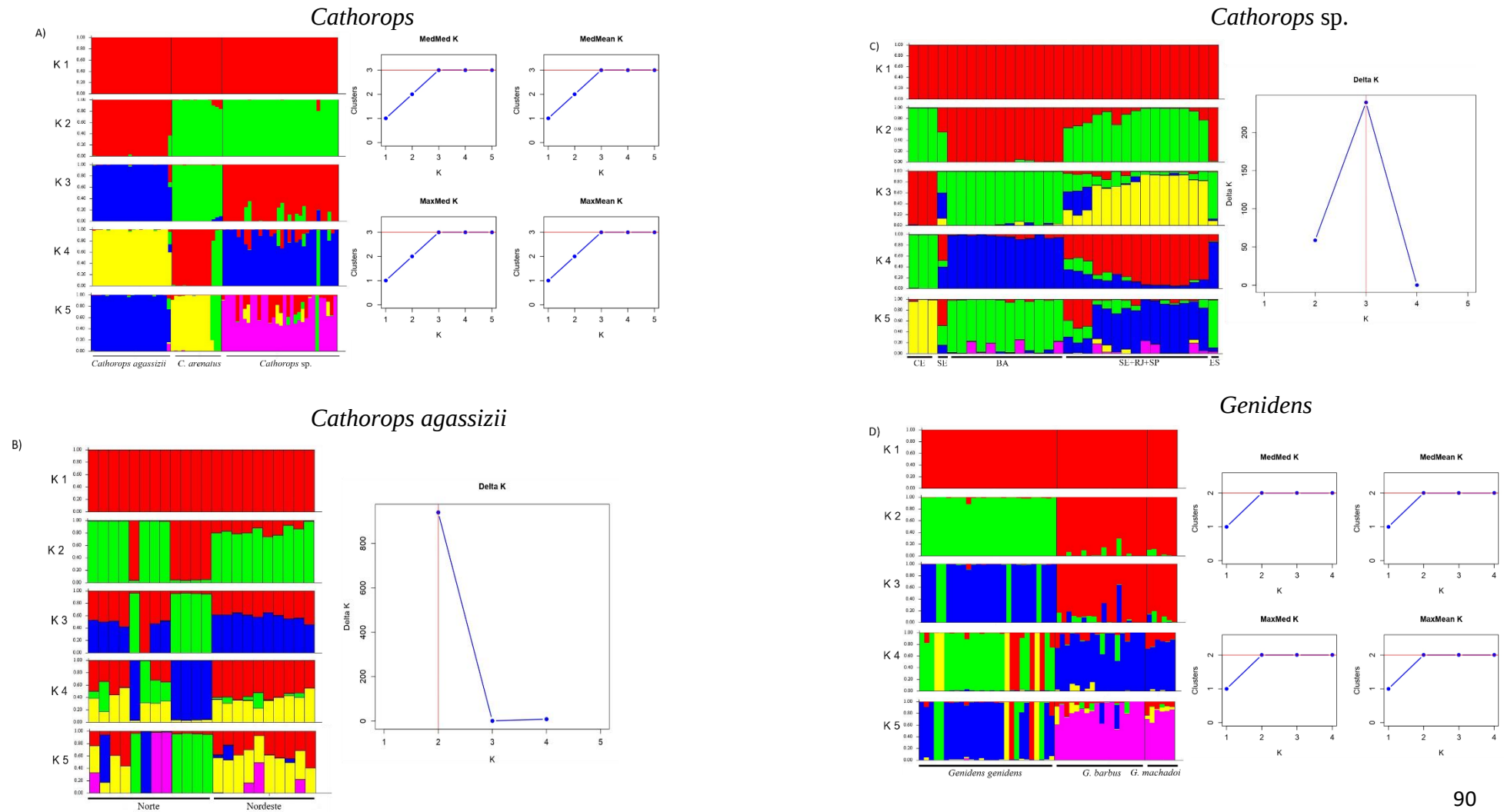
S3. Sumário do sequenciamento *ddRAD* e processamento das sequências dos indivíduos do gênero *Genidens* da costa do Brasil.

Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	134 pb
57	<i>Genidens barbus</i>	Tramandaí Imbé - RS	569.360	565.857	519.334	308.425
59	<i>Genidens barbus</i>	Tramandaí Imbé - RS	569.360	565.847	519.334	308.425
61	<i>Genidens barbus</i>	Tramandaí Imbé - RS	569.360	565.847	519.334	308.425
02	<i>Genidens barbus</i>	Laguna - SC	545.751	542.026	498.824	332.787
4060	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP	538.186	534.527	490.645	309.973
91944	<i>Genidens machadoi</i>	Mongaguá - SP	526.437	520.059	468.214	323.020
06	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	499.727	495.792	453.385	306.598
48674	<i>Genidens barbus</i>	Rio de Janeiro - RJ	483.123	479.937	432.784	282.453
18770	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP	472.451	468.952	430.542	279.424
82527	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro	429.398	425.618	389.452	276.218
96546	<i>Genidens barbus</i>	Santos - SP	421.979	417.845	379.121	293.321
91343	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	419.652	416.003	378.377	258.637
58	<i>Genidens genidens</i>	Rio Grande do Sul	401.745	398.462	364.595	281.025
01	<i>Genidens machadoi</i>	Santos - SP	402.465	399.276	360.304	242.484
96547	<i>Genidens barbus</i>	Santos - SP	397.154	394.022	354.408	250.653
18768	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP	382.125	378.861	346.566	238.654
73313	<i>Genidens barbus</i>	Balneário Camburío - SC	368.755	364.811	326.867	244.908
18769	<i>Genidens genidens</i>	Ubatuba - SP	361.863	359.074	321.465	227.272
98962	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	334.269	331.682	303.013	219.936
98963	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	334.269	331.682	303.013	219.936
85044	<i>Genidens machadoi</i>	Itanhaém - SP	344.959	341.026	301.288	211.283
05	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	322.590	319.455	290.921	217.304
18	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	322.590	319.455	290.921	217.304

Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	134 pb
82524	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro	305.161	302.117	274.608	201.221
93786	<i>Genidens genidens</i>	Peruíbe -SP	300.099	297.101	268.248	200.823
98958	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	290.888	287.735	262.357	194.148
86539	<i>Genidens genidens</i>	Santos - SP	282.274	279.890	255.403	168.741
87309	<i>Genidens barbatus</i>	Santa Catarina - SC	284.832	281.493	252.672	184.496
98961	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	275.442	273.101	249.757	195.453
05	<i>Genidens machadoi</i>	Santos - SP	285.458	281.349	248.969	177.602
90863	<i>Genidens machadoi</i>	Itanhaém - SP	271.408	267.690	239.640	176.081
82528	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro	265.636	262.402	237.114	185.355
51374	<i>Genidens barbatus</i>	Cananéia - SP	271.260	267.009	235.155	175.066
82579	<i>Genidens barbatus</i>	Rio de Janeiro - RJ	269.149	265.438	234.289	173.588
96545	<i>Genidens barbatus</i>	Santos - SP	258.929	255.662	229.274	173.529
82526	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro	253.452	251.265	228.442	160.773
86193	<i>Genidens barbatus</i>	Bombinha - SC	256.315	253.827	225.510	170.308
82525	<i>Genidens genidens</i>	Rio de Janeiro	230.245	228.064	207.311	151.930
03	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	226.607	224.436	205.052	161.964
10	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	226.607	224.436	205.052	161.964
82577	<i>Genidens barbatus</i>	Rio de Janeiro - RJ	231.352	228.513	204.592	150.999
02	<i>Genidens machadoi</i>	Santos - SP	230.362	227.237	202.129	143.259
01	<i>Genidens barbatus</i>	Laguna - SC	197.071	194.732	174.086	133.839
86142	<i>Genidens genidens</i>	Balneário Camburió - SC	192.604	189.982	171.318	139.484
08	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	189.102	186.824	168.218	142.148
21	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	189.102	186.824	168.218	142.148
04	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	166.861	164.193	146.749	139.554
09	<i>Genidens genidens</i>	Laguna - SC	166.861	164.193	146.749	139.554

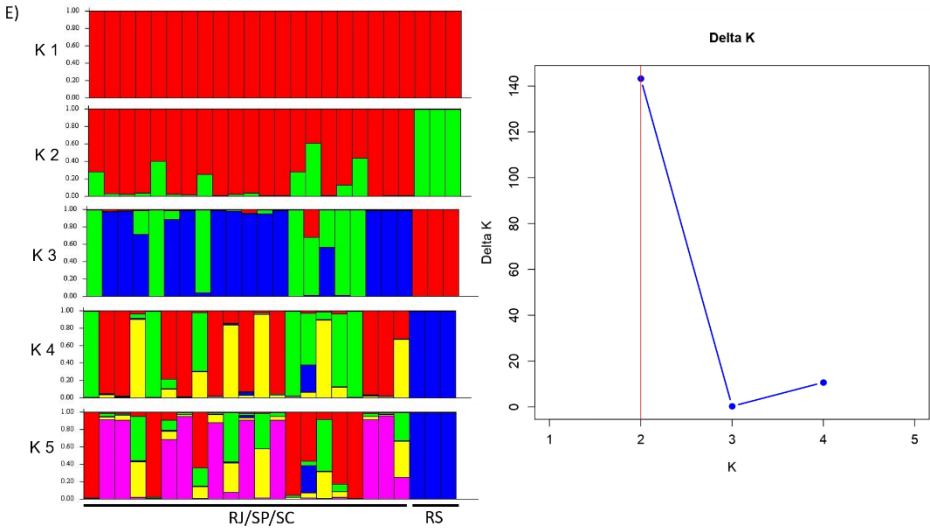
Amostras	Espécie	Localidade	Raw Date	Quality Filtering 20	Non-Digested	134 pb
86540	<i>Genidens genidens</i>	Santos - SP	161.961	159.468	140.880	110.475
82578	<i>Genidens barbatus</i>	Rio de Janeiro - RJ	159.982	157.289	135.241	109.415
98964	<i>Genidens genidens</i>	Espírito Santo	133.901	132.119	117.354	111.300

S4. Gráficos da análise Bayesiana do STRUCTURE evidenciando os testes realizados para os valores de K 1 a 5 estimados para o gênero *Cathorops* e *Genidens* e suas respectivas espécies e o melhor valor de K. Legenda: A) *Cathorops*; B) *Cathorops agassizii*; C) *Cathorops* sp.; D) *Genidens*; E) *Genidens barbatus*; F) *G. genidens*.



Continuação

Genidens barbus



Genidens genidens

