

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos/PPG-DIBICT

ALANY ITALA PONTES NASCIMENTO

Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no Pleistoceno na diversificação evolutiva de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental

MACEIÓ - AL
Abril/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos/PPG-DIBICT

ALANY ITALA PONTES NASCIMENTO

Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no Pleistoceno na diversificação evolutiva de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Biodiversidade.

Orientador: Dr. Uedson Pereira Jacobina

Coorientadora: Dra. Marina Vianna Loeb

MACEIÓ - AL
Abril/2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

N244e Nascimento, Alany Itala Pontes.

Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no pleistoceno na diversificação evolutiva de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental / Alany Itala Pontes Nascimento. – 2022.
52 f. : il.

Orientador: Uedson Pereira Jacobina.

Coorientadora: Marina Vianna Loeb.

Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos. Maceió, 2022.

Inclui bibliografias.

1. Biogeografia. 2. Diversidade genética. 3. Estruturação genética. 4. Mudanças climáticas. I. Título.

CDU: 575:551.583


Folha de aprovação

Alany Itala Pontes Nascimento

Estrutura filogeográfica Revela a Influência das Flutuações Climáticas no Pleistoceno na Diversificação Evolutiva de *Lycengraulis grossidens*(Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS na área da Biodiversidade.

Dissertação aprovada em 29 de abril de 2022.

Documento assinado digitalmente
 UEDSON PEREIRA JACOBINA
Data: 06/07/2022 11:21:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr.^(a) Presidente – Uedson Pereira Jacobina/UFAL



Dr. (a) – Kim Ribeiro Barão



Dr. (a) – Luis Gustavo Rodrigues Souza



Dr. (a) – Silvia Britto Barreto

MACEIÓ - AL
Abril/2022

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação à minha
família que sempre acreditou em mim,
mesmo quando nem eu acreditei.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido discernimento e sabedoria para superar todas as adversidades nessa trajetória, e por todas as oportunidades de conhecimento, seja na área pessoal ou profissional.

Aos meus pais por todo incentivo, mesmo sem entender o que estava fazendo, por todos os ensinamentos, apoio e educação.

A todos os meus familiares, que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse concretizar mais essa etapa, sendo financeiramente ou emocionalmente e por sempre me fazerem acreditar que daria tudo certo.

Aos amigos de laboratório Carolina Farias, Leandro Santos, Denis Marques por toda parceria e reuniões até tarde da noite. Por todo estímulo, força e ajuda, principalmente de última hora.

Ao meu orientador Prof. Dr. Uedson Pereira Jacobina, por estar em mais uma etapa comigo, por toda confiança a mim concedida, pela amizade, pelos puxões de orelha e por ter me proporcionado constantes momentos de aprendizagem os quais levarei comigo por toda vida.

À Profa. Dra. Marina Vianna Loeb, minha coorientadora, pela contribuição e ajuda desde o início desta jornada, muito obrigada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos (PPG-DIBICT) da Universidade Federal de Alagoas, por todo conhecimento repassado. Também a todos os meus colegas de Mestrado que de alguma forma me ajudaram, em especial ao João do Laboratório de Biologia Integrativa, pela paciência e pelo compartilhamento de ensinamentos de bancada, e também à Ju (secretária do PPG), que desde o início me auxiliou e conseguiu resolver todos os problemas burocráticos.

Aos professores parceiros que contribuíram de alguma forma, seja com material para o desenvolvimento da Pesquisa, no auxílio em algumas análises, ou até mesmo pelos ensinamentos no Laboratório (Ana Mai, Cláudio Oliveira, Henrique Batalha, Tami Mot, Marina Loeb).

E por último e não menos importante ao CNPQ pelo concedimento de bolsa para que eu pudesse me manter e desenvolver minha pesquisa.

Gratidão!

Temos nosso **PRÓPRIO** tempo ...
(Música Legião Urbana)

RESUMO

Durante o Mioceno ocorreram incursões marinhas, frutos da dinâmica do nível do mar, em várias partes do mundo, inclusive na América do Sul, causando avanços e recuos de águas salgadas sobre águas continentais. Com isso, os níveis de salinidade dos ambientes aquáticos foram alterados, permitindo a transição de peixes que toleram variação de salinidade a adentrar em novos ambientes, gerando mudanças evolutivas que resultaram em várias linhagens de peixes, dentre eles, *Lycengraulis grossidens*. *L. grossidens* é uma espécie que possui alta plasticidade no uso do habitat, ocorrendo em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce com ampla distribuição na América do Sul. No que diz respeito aos aspectos genéticos, a maioria dos estudos que avaliaram esse táxon está restrito a uma única região, a porção sul da América do Sul, e pouco se sabe como é a forma de recrutamento dessas populações ao longo da sua distribuição. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade genética dessa espécie ao longo da sua distribuição na costa do Atlântico Ocidental, através de análises filogeográficas, utilizando um gene mitocondrial, Citocromo Oxidase I (COI) e o nuclear Rodopsina (RHOD). Para isso, foram coletados indivíduos em diferentes habitats (água doce, estuarino e marinho), da região norte do Brasil até a Argentina. Nossas análises foram congruentes, indicando a presença de três linhagens, uma de ampla distribuição na costa do Brasil, com ocorrência do norte ao sudeste do Brasil (COSTA), outra na porção Sul do Brasil até o Norte da Argentina (SUL), e outra restrita ao baixo São Francisco (RSF), com alguns indivíduos vivendo em simpatria com a linhagem da COSTA. A linhagem do SUL divergiu das demais a cerca de 400 mil anos, enquanto as linhagens da COSTA e RSF divergiram mais recente, há cerca de 77 mil anos. Essa diferenciação mais recente pode ser explicada pela mudança do curso da foz do rio São Francisco. Com isso destacamos alguns processos associados as mudanças climáticas, ecológicas e geomorfológicas que os indivíduos de *L. grossidens* experimentou durante a sua diversificação no Pleistoceno.

Palavras-chave: Biogeografia, Diversidade Genética, Estruturação Genética, Mudanças Climáticas.

ABSTRACT

During the Miocene, marine incursions occurred, as a result of the dynamics of the sea level, in various parts of the world, including South America, causing advances and retreats of salty waters over continental waters. With this, the salinity levels of aquatic environments were altered, allowing the transition of fish that tolerate salinity variation to enter new environments, generating evolutionary changes that resulted in several lineages of fish, among them *Lycengraulis grossidens*. *L. grossidens* is a species that has high plasticity in habitat use, occurring in marine, estuarine, and freshwater environments with a wide distribution in South America. Regarding the genetic aspects, most of the studies that have evaluated this taxon are restricted to a single region, the southern portion of South America, and little is known about the form of recruitment of these populations throughout its distribution. In this context, the objective of this study was to evaluate the genetic diversity of this species along its distribution in the Western Atlantic coast, through phylogeographic analysis using a mitochondrial gene, Cytochrome Oxidase I (COI) and a nuclear Rhodopsin (RHOD) gene. For this purpose, individuals were collected in different habitats (freshwater, estuarine and marine) from the northern region of Brazil to Argentina. Our analyses were congruent indicating the presence of three lineages, one with a wide distribution along the Brazilian coast, occurring from northern to southeastern Brazil (COSTA), another from the southern portion of Brazil to northern Argentina (SUL), and another restricted to the lower São Francisco (RSF) with some individuals living in sympatry with the COSTA lineage. The SUL lineage diverged from the others about 400 thousand years ago, while the COSTA and RSF lineages diverged more recently, about 77 thousand years ago. This more recent divergence can be explained by the change in the course of the São Francisco River mouth. With this we highlight some processes associated with climatic, ecological and geomorphological changes that individuals of *L. grossidens* experienced during its diversification in the Pleistocene.

Keywords: Biogeography, Genetic Diversity, Gene Structure, Climate Change.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa das localidades das amostras de *Lycengraulis grossidens* ao longo da costa da América do Sul. À direita: Rede de haplótipos com o gene COI; o grupo A refere-se ao haplogrupo SUL, o grupo B ao RSF e o grupo C ao haplogrupo do COSTA. À esquerda: Rede de haplótipos da região nuclear Rhod; o grupo D reúne os indivíduos da COSTA e RSF, e o grupo E reúne indivíduos do SUL. Os traços entre os haplótipos representam os passos de mutações..... 34
- Figura 2.** Topologia obtida por inferência Bayesiana baseada em mtDNA. Os números nos nós representam valores de probabilidade posteriores. As letras A, B e C representam o agrupamento das linhagens, sendo o grupo A referente aos indivíduos do haplogrupo SUL, o grupo B aos indivíduos do haplogrupo RSF e o grupo C indivíduos do haplogrupo COSTA 35
- Figura 3.** Estrutura populacional espacial de *Lycengraulis grossidens* obtida pelo Geneland. À esquerda, gráfico com a densidade da verossimilhança marginal para cada k. Nos mapas, os pontos pretos representam as localidades amostradas, e as cores indicam a probabilidade de pertencer ao cluster inferido, sendo o vermelho maior probabilidade e o amarelo menor probabilidade: (A) grupo SUL, com localidades de Santa Catarina ao Norte da Argentina, (B) grupo COSTA, com localidades ao longo da costa e (C) grupo SFR com localidades no Rio São Francisco. Os números no eixo x indicam as coordenadas de latitude e no eixo y as coordenadas de longitude 36
- Figura 4.** Cronograma da árvore coalescente multiespécies a partir dos conjuntos de dados mitocondriais e nucleares: A (SUL-1) e B (COSTA-2 e RSF-3). Os números nos nós representam alta densidade posterior e as linhas cinzas os tempos de divergência (k_a) entre os clados. Linhas esmaecidas representam cada árvore amostrada, enquanto a árvore de consenso é representada pela linha azul grossa..... 37
- Figura 5.** Bayesian skyline plot. Indicação das mudanças estimadas no tamanho populacional efetivo sobre o tempo para o gene COI das populações de *Lycengraulis grossidens*. A linha tracejada representa a estimativa mediana, enquanto as marcações em cinza representam os intervalos 95% highest-posterior-density (HPD). A primeira refere-se à população da COSTA, a segunda a população do RSF e a última a população do SUL..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises de variância molecular (AMOVA) em *Lycengraulis grossidens*..... 37

Tabela S1. Localidade e tipo de ambiente para amostras de amplificação para o COI 50

Tabela S2. Localidade e tipo de ambiente para amostras de amplificação para Rodopsina 53

SUMÁRIO

1	Apresentação.....	13
2	Revisão de Literatura.....	15
2.1	Incursões Marinhas.....	15
2.2	Relações Sistemáticas em Engraulidae	17
2.3	Filogeografia.....	18
	Referências	21
3.0	Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no Pleistoceno na diversificação evolutiva de <i>Lycengraulis grossidens</i> (Clupeiformes Engraulidae) no Atlântico Ocidental.....	26
3.1.	Introdução	27
3.2.	Material e Métodos	30
3.2.1.	Área de Estudo	30
3.2.2.	Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	30
3.2.3.	Análise dos dados.....	31
3.3.	Resultados	34
3.3.1.	Diversidade Genética, Análises Filogenética e Delimitação de Espécie	34
3.3.2.	Árvore multiespécie e Tempo de divergência.....	38
3.3.3.	Demografia histórica.....	39
3.4.	Discussão	38
	Considerações Finais.....	43
	Referências	44
	Material Suplementar	50

1 Apresentação

Flutuações do nível do mar ocorreram em várias partes do mundo, inclusive na América do Sul (Hoorn, 1994). Estes avanços e recuos marinhos modificaram principalmente as regiões costeiras em sua fisiografia, assim como formaram paleodrenagens que culminaram na conectividade entre rios e/ou isolamento no passado (Thomaz & Knowles, 2018). Além disso, as alterações de salinidade nas águas continentais durante as incursões marinhas permitiram que peixes tolerantes à variação de salinidade adentrassem e se estabelecessem em novos habitats, gerando processos de especiação e/ou promovendo diversidade genética (Lovejoy, Albert & Crampton, 2006; Dias *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, estudos genéticos envolvendo abordagens filogeográficas têm permitido entender como a atual distribuição populacional das diferentes espécies se estabeleceu no espaço e no tempo (Avise, 2000; Chenoweth *et al.*, 2002; Carnaval *et al.*, 2014). No ambiente marinho, esses estudos têm revelado padrões e processos que moldaram a diversidade que o habita (Briggs & Bowen, 2012). Tais informações são também de suma importância para fins conservacionistas, pois para realizar o manejo adequado e criar leis de proteção, é necessário acessar e conhecer a diversidade genética intraespecífica, ou até mesmo verificar a existência de possíveis Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs; McMahon *et al.*, 2014).

Na costa da América do Sul, *L. grossidens* é uma espécie de peixe com ampla distribuição, de origem marinha, porém devido à sua alta capacidade eurihalina, adentra estuários e ambientes de água doce (Whitehead *et al.*, 1988; Mai & Vieira, 2013) Essa alta plasticidade, tem sido alvo de questionamento entre diversos pesquisadores, uma vez que esse táxon acaba violando a delimitação de regiões zoogeográficas distintas, entre os ambientes de água doce e marinho (Mai & Vieira, 2013). Poucas espécies toleram essas mudanças abruptas nos fatores iônicos e osmorregulatórios que afetam sua fisiologia, o que culmina em modificações pronunciadas na composição faunística entre o mar, os estuários e o ambiente de água doce (Winemiller & Leslie, 1992; Blaber, 2000). Esses fatores parecem não

afetar o uso múltiplo do habitat por *L. grossidens*. Alguns trabalhos já sinalizam que seu status taxonômico precisa ser revisado, uma vez que quatro morfotipos têm sido detectados ao longo da costa do Brasil (Lovejoy *et al.*, 2006; Mai & Vieira, 2013; Loeb, 2016). Uma das formas para avaliar a sua identidade é por meio de estudos genéticos, para que se possa entender o grau de conectividade entre as populações ao longo da sua distribuição, utilizando abordagens filogenéticas e filogeográficas em um contexto temporal.

Nesse contexto, a presente dissertação inicia com um referencial teórico e em seguida o artigo intitulado: Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no Pleistoceno na diversificação evolutiva de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental.

2 Revisão de Literatura

2.1 - Incursões Marinhas

O planeta Terra experimentou diversos períodos de glaciações e interglaciações, com avanços e recuos do nível do mar, afetando a biota aquática de regiões costeiras e estuarinas mundialmente (Brown & Lomolino, 1998). A elevação do nível do mar promoveu as incursões marinhas, que levaram várias espécies a adentrarem no continente (Lovejoy *et al.*, 1998). Durante esses períodos de maior temperatura, as massas de gelo derreteram, culminando no aumento das águas marítimas em todo o globo terrestre em aproximadamente 100m (Brown & Lomolino, 1998). Isso permitiu que espécies de águas salgadas pudessem se adaptar em ambientes de água doce, gerando rotas de colonização e transição evolutiva, promovendo processos de especiação (Lovejoy *et al.*, 1998; Hubert & Renno, 2006; Lovejoy *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2011). Por outro lado, quando a temperatura baixou e ocorreu o congelamento de grandes massas de gelo, houve o isolamento de populações que adentraram anteriormente os continentes, onde puderam experimentar processos de extinção ou de adaptação e especiação (Lovejoy *et al.*, 2006).

Esses processos repetidos de glaciação e interglaciação, os quais têm sido documentados desde o Mioceno, provocaram grandes mudanças na biodiversidade, embora ainda se discuta a quantidade de vezes e a extensão dos efeitos nesse período (Haq *et al.*, 1987). Já durante o Pleistoceno estes processos estão mais documentados, e estima-se que ocorreram pelo menos 50 desses ciclos glaciais e interglaciais (Woodruff, 2010; Ludt & Rocha, 2015; Aimola & Moura, 2016). Durante esse período, a formação de paleodrenagens permitiu cenários de isolamento e/ou conexão entre faunas aquáticas, com detecções de contato secundário, os quais tem sido reportado em várias partes do globo, no Noroeste Europeu (Dursar *et al.*, 2000), no Leste Asiático (Yang *et al.*, 2013), na Austrália (La Croix *et al.*, 2020), na China (Liuwen Xia *et al.*, 2019), assim como na região Neotropical (Lovejoy *et al.*, 1998; Wesselingh & Salo, 2006; Hoorn *et al.*, 2010).

Na região Neotropical, mais especificamente na América do Sul, a plataforma

continental, com cerca de 12.500 km de comprimento, possui grande variação de largura e profundidade ao longo de sua extensão (Baggio *et al.*, 2017). As regiões Norte e Sul apresentam as maiores extensões (cerca de 330 km e 380 km, respectivamente), enquanto a região Nordeste do Brasil possui as menores extensões, com variação média de 90 km. Já com relação à quebra da plataforma continental (profundidade), a região Sul varia de 60m a 180m, enquanto a região Norte varia entre 75m e 80m, e a região Nordeste de 40m a 80m (Coutinho, 2005; Vital *et al.*, 2010; Goes & Ferreira Jr., 2011). Devido a essa heterogeneidade, a Plataforma Continental Sul Americana foi exposta de forma variada durante os ciclos glaciais, permitindo contato e/ou isolamento entre organismos de diferentes habitats aquáticos, promovendo diversificação de espécies nesses ambientes costeiros (Coutinho, 2005).

Segundo Thomaz & Knowles (2018), durante as variações do nível do mar, com recuo das águas marinhas, diferentes rios foram conectados em uma única bacia, de forma que plataformas maiores forneceram áreas mais extensas para essas conexões, possibilitando troca de espécies e conectividade de populações entre ambientes de água doce. No entanto, para plataformas estreitas, a possibilidade de contato entre bacias diferentes e a troca de espécies foram reduzidas (Baggio *et al.*, 2017). Acredita-se que para algumas espécies marinhas, o efeito pode ter sido reverso, quando o mar avançava, acontecia oportunidade para a expansão de sua distribuição, e quando o mar recuava uma série de lagos eram formados, isolando populações que podem ter se adaptado a esses novos ambientes (Nuttall, 1990). Nesse processo de reconexão, teoricamente não conseguiriam manter o fluxo gênico entre as populações marinhas (Lovejoy *et al.*, 2006).

Eventos repetidos de isolamento e reconexões entre ambientes aquáticos, permitiram intercâmbio de faunas, seja pela disponibilidade de novos habitats, reorientação de drenagens e/ou variação de salinidade, culminando em processos de invasão/adaptação e diversificação em novos ambientes, o que está de acordo com a hipótese de diversificação por pulso, proposta inicialmente por Erwin (1979). Além disso, outro fator que deve ser levado em consideração nesses eventos de glaciação é o tempo, pois quanto mais tempo os organismos ficam isolados, maior é a probabilidade de formarem populações com alta diversidade genética e/ou até mesmo

formação de espécies crípticas (Erwin, 1981; Baggio *et al.*, 2017).

1.2 Relações Sistemáticas em Engraulidae

Na região neotropical, uma das famílias que experimentaram essas transições evolutivas é Engraulidae (Bloom & Lovejoy, 2012). A família Engraulidae é de ampla distribuição não só nessa região, mas em várias partes do mundo, em regiões tropicais e subtropicais, onde são comumente conhecidos como anchovas e arenques (Nelson, 2016). A família compreende 16 gêneros, com 179 espécies, distinguidas pela presença de um focinho proeminente, articulação mandibular localizada posteriormente na cabeça, escamas facilmente destacadas do corpo, ausência de linha lateral e espinhos em todas as nadadeiras (Whitehead *et al.*, 1988; Nizinski & Munroe, 2002; Kullander & Ferraris, 2003; Fricke *et al.*, 2022). A maioria dos representantes desta família são peixes planctívoros marinhos de pequeno a médio porte, que formam grandes cardumes em habitats próximos à costa (Nelson, 2016). No entanto, também inclui alguns gêneros que exibem notável diversidade no uso do habitat, abrangendo ambientes marinhos, estuarinos e de água doce, com grande diversidade trófica, como é o caso dos gêneros *Anchoviella*, *Lycengraulis* e *Pterengraulis* (Nelson, 2016).

No que diz respeito aos aspectos filogenéticos, alguns representantes da família Engraulidae de água doce da América do Sul, são produtos de transição do ambiente marinho para o dulcícola, ocorrida durante o Mioceno (Albert & Reis, 2011). Nesse contexto, se destaca o gênero *Lycengraulis*, representado por quatro espécies (*L. batesii*, *L. grossidens*, *L. figueredoi* e *L. poey*). A origem desse gênero é de água doce, na bacia Amazônica, sendo *L. batesii* considerado o táxon mais antigo, enquanto *L. poeyi* e *L. grossidens* mais recentemente, onde retornaram ao ambiente marinho (Bloom & Lovejoy, 2012). Em relação ao outro táxon *L. figueredoi*, embora tenha sido descrito nos últimos anos, a sua posição filogenética ainda permanece desconhecida (Loeb *et al.*, 2013).

Dentre as quatro espécies, *L. grossidens* (Spix & Agassiz, 1829) é a que possui a maior distribuição ao longo da América do Sul, com ocorrência de Belize à Argentina (Fricke *et al.*, 2022). É um táxon que possui uma diversidade ecológica altamente

plástica, uma vez que é encontrado em ambientes marinhos e estuarinos, migrando para os rios de água doce em épocas reprodutivas, o que sugere que guarda resquícios do seu estado ancestral (Mai & Vieira, 2013). É uma espécie principalmente piscívora, mas também é conhecida por se alimentar de crustáceos, moluscos e larvas de insetos (Fuster de Plaza & Boschi, 1961; Mai & Vieira, 2013). Ao longo da sua distribuição, populações de *L. grossidens* têm sido documentadas em épocas reprodutivas nas bacias do Amazonas, Orinoco, Paraná e Parnaíba (Fuster de Plaza & Boschi, 1961; Whitehead *et al.*, 1988; Kullander & Ferraris, 2003; Mai & Vieira, 2013; Mai *et al.*, 2014). Apesar de sua ampla distribuição, pouco ainda se sabe sobre os modos de recrutamento dessas populações no Atlântico Ocidental, onde adentram em diversos habitats (Mai & Vieira, 2013; Mai *et al.*, 2014).

Na porção sul da província marinha brasileira, Mai *et al.* (2016) detectaram duas populações, sendo uma residente exclusiva de água doce no rio Uruguai, e outra população panmítica estuarina, sendo esta última considerada a população que derivou há mais tempo das demais. Os autores sugerem que rotas de colonização continental associadas a conexões antigas entre as bacias Amazônica e do Paraná podem ter atuado na diversificação desse táxon, seguido por novas transições para a região costeira durante as flutuações do nível do mar (Mai *et al.*, 2016). Já um outro estudo, baseado em caracteres morfológicos através de otólitos e dados merísticos detectou a presença de quatro populações diferentes ao longo da costa brasileira. Uma no litoral do Pará, outra no litoral do estado do Ceará ao litoral do Espírito Santo, a terceira entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, e a última restrita à porção Sul, sendo distribuída entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, o que tem sinalizado para a possível presença de espécies crípticas (Silva, 2006). Entretanto, essas informações não foram avaliadas no que diz respeito aos aspectos filogeográficos.

1.3 Filogeografia

Há muito tempo abordagens moleculares vêm sendo empregadas para desvendar as histórias e padrões de biodiversidade (Avice, 2000). A filogeografia, por exemplo, foi proposta pela primeira vez por Avice e colaboradores na década de 80, e tinha como principal objetivo elucidar as relações genéticas entre populações

através do uso combinado de filogenias e conceitos biogeográficos (Avice, 2000). Sendo assim, a Filogeografia busca entender padrões e processos históricos que moldaram a distribuição e diversidade dos organismos, principalmente em grupos de ampla distribuição (Avice, 2000; Carpenter *et al.*, 2011; DiBattista *et al.*, 2013).

Estudos filogeográficos têm utilizado principalmente marcadores moleculares mitocondriais, ou seja, de herança materna, sem recombinação, e tamanho relativamente pequeno, quando comparado com o DNA nuclear (Arias *et al.*, 2003). Além disso, possui alta taxa de mutação evolutiva, sendo assim uma boa fonte de informações genéticas para estudos (Zolet *et al.*, 2017). Aliados aos marcadores mitocondriais, marcadores nucleares com informações biparentais também têm sido utilizados, para auxiliar na confirmação dos resultados dos mitocondriais, pois apesar de ter uma taxa de mutação menor, é capaz de identificar o monofilismo dos grupos estudados (Rosa & Paiva, 2009). O uso do DNA mitocondrial combinado com marcadores nucleares cresceu nas últimas décadas, para a obtenção de informações complementares, pois dependendo da região do DNA mitocondrial, os padrões encontrados podem refletir processos mais recentes (Avice, 2009; Ducan *et al.*, 2006). Por outro lado, os resultados obtidos com genomas nucleares podem refletir padrões mais antigos e recuperar a história de dispersão e vicariância de algumas linhagens (Silvério, 2010; Toews & Brelsford, 2012).

Nas últimas décadas, a região mitocondrial, Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), conhecida popularmente como DNA barcode, tem sido utilizada de forma abrangente na detecção de vários táxons e linhagens crípticas (Quattro *et al.*, 2006; Almerón *et al.*, 2018). Além disso, este marcador também tem sido usado para compreender as relações genealógicas através do tempo e do espaço, bem como em grupos filogeográficos (Jacobina *et al.*, 2018, 2020). Aliado a este marcador, métodos de delimitação de espécies cada vez mais robustos vêm sendo utilizados para detecção de grupos monofiléticos e de espécies crípticas (Puillandre *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Lukhtanov, 2019; Zimmermann *et al.*, 2021).

Aliado a esse marcador mitocondrial, um marcador nuclear que vem sendo utilizado conjuntamente para essas abordagens filogeográficas é a rodopsina, que pertence à família das opsinas (Sevilla *et al.*, 2007). A rodopsina é responsável por

capturar a luz visível ou capturar imagem, tendo comprimento de onda médio e genes sensíveis à coloração verde que são essenciais para vertebrados aquáticos, principalmente os peixes, pois viabiliza a busca de alimentos, parceiros e assegura relações interespecíficas e intraespecíficas (Chen *et al.*, 2001; Sabbah *et al.*, 2010). Esse gene foi utilizado para complementar as informações de sequências mitocondriais em análises populacionais de outras espécies de peixes (Larmuseau *et al.*, 2009), bem como aplicado para inferência de estoques pesqueiros (Carvalho & Hauser 1994; Ovenden *et al.*, 2015). Além disso, tem sido utilizado para entender os efeitos históricos, atrelado as mudanças climáticas que alterou a profundidade de regiões costeiras e segregou algumas linhagens de peixes (Shum *et al.*, 2015).

Mudanças eustáticas do nível do mar durante o Pleistoceno têm sido preditoras para entender possíveis cenários de isolamento e/ou diversificação em populações de peixes marinhos, estuarinos e de água doce na região Neotropical (Lovejoy *et al.*, 2006; Thomaz *et al.*, 2018). Neste cenário, o comportamento distinto de *L. grossidens* na exploração de diferentes habitats (costeiros, estuarinos e de água doce), se torna um excelente modelo biológico para avaliar os efeitos históricos de suas populações ao longo da sua distribuição.

Na presente dissertação, avaliamos a diversidade genética e filogenética de *L. grossidens*, utilizando dois marcadores moleculares, um mitocondrial (COI) e outro nuclear (Rodopsina), visando testar duas hipóteses. A primeiro cenário sugere que os efeitos dinâmicos no Pleistoceno, aliados à heterogeneidade da plataforma continental podem ter promovido o isolamento e diversificação em populações de *L. grossidens* ao longo da sua distribuição. O outro cenário seria mais antigo, baseado nas incursões marinhas do Mioceno, uma hipótese levantada por Mai *et al.* (2014), para explicar populações residentes de água doce altamente estruturadas no Sul do Brasil. Essa hipótese antiga sugere uma rota de conexão Amazônica com a bacia do Paraná. Para testar ambas as hipóteses, exemplares coletados em diferentes tipos de habitats (água doce, estuarino e marinhos) foram avaliados ao longo de sua ocorrência do Norte do Brasil ao Norte da Argentina.

Referências

- Aimola, L. & Moura, M. (2016). "A Influência Da Circulação de Revolvimento Meridional Do Atlântico Na Definição Da Posição Média Da ZCIT Ao Norte Do Equador. Uma Revisão." **Revista Brasileira de Meteorologia**. 31(4): 555–63.
- Arias, M. C., Francisco, F.O. & Silvestre, D. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Editora UNESC**, Criciúma, pp. 305-309.
- Albert, J. S., Petry, P. & Reis, R. E. T. (2011). Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. **University of California Press**. p. 21-58.
- Almerón, F. S. *et al.* (2018). Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA barcoding: evidence for mislabeling and trade of endangered species. **Frontiers in genetics**, 9, 138.
- Avise, J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts: **Harvard University Press**.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of biogeography**, 36(1), 3-15.
- Baggio, R. A., Stoiev, S. B., Spach, H. L. & Boeger, W. A. (2017). "Opportunity and Taxon Pulse: The Central Influence of Coastal Geomorphology on Genetic Diversification and Endemism of Strict Estuarine Species." **Journal of Biogeography** 44(7): 1626–39.
- Blaber, S. J. M. (2000). Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation and conservation. **Blackwell Science Ltd**.
- Bloom, D.D. & Lovejoy, N.R. (2012). Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). **Journal of Evolutionary Biology**, 25: 701-715.
- Briggs, J. C. & Bowen, B. W. (2012). A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. **Journal of Biogeography**, 39(1), 12–30.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. 1998. **Biogeography**. 2nd Ed. Sunderland, Massachusetts (Sinauer Associates, Inc. Publishers). — 691 S.
- Carnaval, A.C. *et al.* (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proc Biol Sci**. 281(1792):20141461. doi: 10.1098/rspb.2014.1461. PMID: 25122231; PMCID: PMC4150330.
- Carpenter, K.E. *et al.*, (2011). "Comparative Phylogeography of the Coral Triangle and Implications for Marine Management", **Journal of Marine Sciences**, vol. 2011, Article ID 396982, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/396982>
- Carvalho GR e Hauser L (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4, 326-350.
- Chen, P. *et al.* (2001). A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 256–260.
- Chenoweth, S., Hughes, J., Connolly, R. (2002). Phylogeography of the pipefish, *Urocampus carinirostris*, suggests secondary intergradation of ancient lineages. **Marine Biology**, v. 141, n. 3, p. 541-547.
- Cooke, G. M., Chao, N. L. & Beheregaray, L. B. (2012). Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). **Journal of Biogeography**, 39(4), 724-738.

- Coutinho, P. N. (2005). Levantamento do estado da arte da pesquisa dos recursos vivos marinhos. Oceanografia Geológica. **PROGRAMA REVIZEE. FEMAR/SECIRM**, Brasília.
- Dias, M. S. *et al.* (2014). “Global Imprint of Historical Connectivity on Freshwater Fish Biodiversity.” **Ecology Letters**. 17(9): 1130–40.
- DiBattista, J. D. *et al.* (2013). After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. **Journal Biogeography**.
- Duncan, K.M., Martin, A.P.B., Bowen, W., & Couet, H.G. (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). **Molecular Ecology**. 15: 2239–2251.
- Erwin, T.L. 1981. Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. **Vicariance biogeography**.
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., & Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 149(4), 435-446.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Van der Laan, R. (eds) 2022. **Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References**.
- Fuster De Plaza, M. L. & Boschi, E. E. (1961). Áreas de inmigración y ecología de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en aguas argentinas (Pisces, Engraulidae). Fac. Cs. Exac. Y Nat., Contrib. Cient., La Plata, Argentina, **Ser. Zool.**, 1(3): 127-183.
- Goes, E. R., & Ferreira Jr, A. V. (2011). “Revista Brasileira de Geografia Física.” **Revista Brasileira de Geografia Física**. 06: 1275–91.
- Halas, D., Zamparo, D. & Brooks, D.R. (2005). A historical biogeographical protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. **Journal of Biogeography**, 32, 249–260.
- Haq, B. U., Hardenbol, J. A. N., & Vail, P. R. (1987). Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. **Science**, 235(4793), 1156-1167.
- Horn, C. (1994). “An Environmental Reconstruction of the Palaeo-Amazon River System (Middle-Late Miocene, NW Amazonia).” **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. 112(3–4): 187–238.
- Horn, C., Wesselingh, F. P., Ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., ... & Antonelli, A. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **science**, 330(6006), 927-931.
- Hubert, N. & Renno, J.F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436.
- Jacobina, U. P. *et al.* (2018). DNA barcode sheds light on systematics and Evolution of neotropical freshwater trahiras. **Springer Nature Switzerland**.
- Jacobina, U. P., Torres, R. A., de Mello Affonso, P. R. A., dos Santos, E. V., Calado, L. L., & Bitencourt, J. A. (2020). DNA barcoding reveals cryptic diversity and peculiar phylogeographic patterns in mojarras (Perciformes: Gerreidae) from the Caribbean and South-western Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 100(2), 277-283.
- Kullander, S.O. & Ferraris, C.J.Jr. (2003). Family Engraulidae, pp. 39-42. In: Reis, R.E.; Kullander & C.J. Ferraris Jr. (eds.). **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.
- La Croix, A. D., He, J., Bianchi, V., Wang, J., Gonzalez, S., & Undershultz, J. R. (2020).

- Early Jurassic palaeoenvironments in the Surat Basin, Australia—marine incursion into eastern Gondwana. **Sedimentology**, 67(1), 457-485.
- Larmuseau, M.H.D., Raeymaekers, J.A.M., Ruddick, K.G., Van Houdt, J.K.J. & Volckaert, F.A.M. (2009), To see in different seas: spatial variation in the rhodopsin gene of the sand goby (*Pomatoschistus minutus*). **Molecular Ecology**, 18: 4227-4239.
- Loeb, M.V. & Alcântara, A.V. (2013). A new species of *Lycengraulis* Günther, 1868 (Clupeiformes: Engraulinae) from the Amazon basin, Brazil, with comments on *Lycengraulis batesii* (Günther, 1868). **Zootaxa**, 3693 (2): 200-206
- Loeb, M.V. (2016). Relações filogenéticas de Engraulinae e revisão do gênero *Anchoviella* Fowler, 1911 (Clupeiformes, Engraulidae). **PhD Thesis**. Universidade de São Paulo. 241 pp.
- Lovejoy, N.R.; Birmingham, E. & Martin, A.P. (1998). South American rays came in with the sea. **Nature**, 396:421-422.
- Lovejoy, N. R., Albert, J. S. & Crampton, W.G.R. (2006). "Miocene Marine Incursions and Marine/Freshwater Transitions: Evidence from Neotropical Fishes." **Journal of South American Earth Sciences**. 21(1–2): 5–13.
- Ludt, W. B. & Rocha, L. A. (2015). Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. **Journal of Biogeography**, 42: 25-38.
- Lukhtanov, V. A. (2019). Species delimitation and analysis of cryptic species diversity in the XXI Century. **Entomological Review** 99 (4): 463–472.
- Mai, A.C.G. & Vieira, J. P. (2013). Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulidae). **Biota Neotropical**. ISSN 1676-0611. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300015>.
- Mai, A.C.G. & Vieira, J.P. (2013). Current knowledge of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Pisces, Clupeiformes, Engraulidae). **Biota Neotropica**, 13 (3): 1-10
- Mai, A.C.G., Robe, L.J., Martins, L.F. & Vieira, J.P.(2016). Genetic relationships between landlocked and coastal populations of *Lycengraulis grossidens* (Engraulidae): a biogeographic hypotheses of occurrence in the Paraná Basin. **Marine and Freshwater Research**, 67: 1-10.
- Mai, A.C.G., Condini, M.V., Albuquerque, C.Q., Loebmann, D., Saint'Pierre, T.D., Miekeley, N. & Vieira, J.P. (2014). High plasticity in habitat use of *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 141: 17-25.
- McMahon, B. J.; Teeling, E. C. & Hognlund, J. (2014). How and why should we implement genomics into conservation?. **Evolutionary applications**, v. 7, n. 9, p. 999-1007.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. **John Wiley & Sons**.
- Nizinski, M.S. & T.A. Munroe. (2002). Order Clupeiformes, Engraulidae. In *The living marine resources of the Western Central Atlantic* (K.E. Carpenter, ed.). **Fao**, Roma, p.764-794.
- Nuttall, C. P. (1990). Review of the Caenozoic heterodont bivalve superfamily Dreissenacea. **Palaeontology**, 33(3), 707-737.
- Ovenden, J.R., Berry, O., Welch, D.J., Buckworth, R.C. & Dichmont, C.M. (2015). Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and

- molecular genetics in the management of wild fisheries. **Fish and Fisheries**.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. A. B. G. D. (2012). Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**. 21. 8, 1864-1877.
- Quattro, J. M., Stoner, D. S. & Driggers, W. B. (2006). Evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (genus *Sphyrna*). **Mar Biol** 148:1143–1155.
- Rosa, A.J. M. P. & Paiva, S.R. (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**. 35 p.
- Sabbah, S., Laria, R. L., Gray, S. M., & Hawryshyn, C. W. (2010). Functional diversity in the color vision of cichlid fishes. **BMC biology**, 8(1), 1-16.
- Sevilla, R.G., Diez, A., Norén, M., Mouchel, O., Jérôme, M. *et al.* (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology**. Notes, 7(5), 730-734.
- Shum, P., Pampoulie, C., Kristinsson, K. & Mariani, S. (2015), Three-dimensional post-glacial expansion and diversification of an exploited oceanic fish. **Mol Ecol**, 24: 3652-3667.
- Silva, M.A. (2006). Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz,1829) ao longo da costa brasileira. **PhD Thesis**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 103 pp.
- Silvério, J. (2010). Identificação genética de espécies de tubarões e monitoramento da pesca no litoral de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de São Paulo. 69 pp.
- Thomaz, A. T., & Knowles, L. L. (2018). “Flowing into the Unknown: Inferred Paleodrainages for Studying the Ichthyofauna of Brazilian Coastal Rivers.” **Neotropical Ichthyology**. 16(3): 1–13.
- Toews, D. P. L. & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**.
- Vital, H. *et al.* (2010). “Characterization of the Brazilian Continental Shelf Adjacent to Rio Grande Do Norte State, Ne Brazil.” **Brazilian Journal of Oceanography** 58(SPEC. ISSUE 1): 43–54.
- Whitehead, P.J.P., Nelson, G.J. & Wongratana, T.(1988). Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2 - Engraulididae. Rome, **FAO**.p. 305 579. (FAO Fish Synopsis n. 125, v.7, pt. 2).
- Wesselingh, F., & Salo, J. A. (2006). A Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. **Scripta Geologica**, 133, 439-458.
- Winemiller, K.O. & Leslie, M.A. (1992). Fish assemblages across a complex, tropical freshwater/marine ecotone. **Environ Biol Fish** 34, 29–50 <https://doi.org/10.1007/BF00004783>
- Woodruff, D. S. (2010). Biogeography and Conservation in Southeast Asia: How 2.7 Million Years of Repeated Environmental Fluctuations Affect Today’s Patterns and the Future of the Remaining Refugial-Phase Biodiversity. **Biodiversity and Conservation**.19(4): 919–41.
- Xia, L., Cao, J., Hu, S., & Li, S. (2019). How marine incursion influences the quality of lacustrine source rocks: The Paleogene Nanxiang Basin, eastern China. **AAPG Bulletin**, 103(5), 1071-1096.
- Yang, Y. T. (2013). An unrecognized major collision of the Okhotomorsk Block with

- East Asia during the Late Cretaceous, constraints on the plate reorganization of the Northwest Pacific. **Earth-Science Reviews**, 126, 96-115.
- Zhang, Z.Q. *et al.* (2013). Animal Biodiversity: an Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). **Zootaxa**, v. 3703, n. 1, p. 82.
- Zimmermann, B. L., Buzatto, I., Santos, S., Giri, F., Teixeira de Mello, F., Crandall, K. A., ... & Bartholomei-Santos, M. L. (2021). Entangled Aeglidae (Decapoda, Anomura): Additional evidence for cryptic species. **Zoologica Scripta**, 50(4), 473-484.
- Zolet, A. C. T. *et al.* (2017). Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**.

Estrutura filogeográfica revela a influência das flutuações climáticas no Pleistoceno na diversificação evolutiva de *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulidae) no Atlântico Ocidental

Alany Itala Pontes ^{a*}, Marina Vianna Loeb ^b, Ana Cecilia Mai ^c, Tami Mott ^d, Henrique Batalha-Filho ^e & Uedson Perreira Jacobina ^a

^aLaboratório de Sistemática Integrativa Molecular. Universidade Federal de Alagoas, Av. Beira Rio, Centro, Penedo, AL, Brasil. Universidade Federal de Alagoas.

^bMuseu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Avenida Nazaré, 481, São Paulo, SP, Brasil.

^cLaboratório de Ictiologia. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brasil.

^dLaboratório de Biologia Integrativa. Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, Brasil.

^eLaboratório de Evolução e Biogeografia. Universidade Federal da Bahia, R. Barão de Jeremoabo, 668, Ondina, Salvador, BA, Brasil.

RESUMO

A plataforma continental da América do Sul foi exposta de diversas formas a mudanças eustáticas e isostáticas durante o Pleistoceno. Sua fisiografia foi modificada formando paleodrenagens que culminaram na conectividade entre ambientes aquáticos distintos, ou isolamento no passado, consequentemente afetando a distribuição dos organismos. Para avaliar esses efeitos históricos, espécies de ampla distribuição que habitam ambientes marinhos e estuarinos são excelentes preditores, principalmente quando se avalia os níveis de sua diversidade genética. No presente trabalho, analisamos a diversidade genética e filogenética de *Lycengraulis grossidens*, uma espécie plástica no uso múltiplo do habitat, de ampla distribuição na América do Sul. Para isso, utilizamos dois genes, um mitocondrial (Citocromo C Oxidase subunidade I) e um nuclear (Rodopsina). Os resultados de nossas análises foram congruentes, detectando a presença de três linhagens que diversificaram durante as eras glaciais e interglaciais no Pleistoceno. Sendo uma linhagem mais antiga, distribuída no extremo sul da sua distribuição, que divergiu há cerca de 400 mil anos, e que se concentra em águas mais frias. Já as outras duas linhagens divergiram mais recentemente, há 77 mil anos, uma é costeira de ampla distribuição do norte ao sudeste do Brasil, e outra mais restrita, com ocorrência na região do baixo rio São

Francisco, nordeste do Brasil (RSF). Esta última parece ter sido isolada pela mudança do curso do rio São Francisco em sua foz, aliado ao estreitamento da plataforma continental. Todos esses processos destacam as rotas evolutivas que *L. grossidens* experimentou durante a sua diversificação. Estes efeitos parecem ter sido moldados por processos climáticos, ecológicos e geomorfológicos durante o Pleistoceno, que culminaram em assinaturas genéticas profundas com linhagens enigmáticas ao longo da sua distribuição.

Palavras-chave: Biogeografia, Dinâmica de Dispersão, Estruturação Genética, Flutuações Climáticas, Linhagens Enigmáticas, Paleodrenagem.

3.1 INTRODUÇÃO

Durante os períodos glaciais e interglaciais do Mioceno e Pleistoceno, ocorreram transgressões e regressões do nível do mar, que modificaram as regiões costeiras em sua fisiografia, influenciando a evolução da paisagem dos ecossistemas, alterando o curso de rios e a distribuição dos organismos (Brown & Lomolino, 1998; Loydell, 2007). Esses eventos provocaram profundos efeitos na dinâmica da biodiversidade, permitindo conexões aquáticas entre diferentes sistemas de água doce e o meio marinho (Lovejoy *et al.*, 1998). Com o recuo do nível do mar, diferentes rios se conectaram em uma única bacia, conhecida por paleodrenagem, contudo, quando o nível do mar avançou limitou essa conexão (Lovejoy *et al.*, 2006). No entanto, esses repetidos eventos podem ter fornecido caminhos para a transição evolutiva e diversificação em muitos organismos aquáticos (Hubert & Renno, 2006). As incursões quanto as regressões marítimas podem também ter funcionado como barreiras para a dispersão de algumas espécies, fragmentando sua distribuição anteriormente contínua, levando à especiação vicariante (Lovejoy *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2011).

Nas regiões costeiras, as extensões das plataformas continentais são preditoras desse contato entre os organismos de diferentes ambientes aquáticos (Weitzman *et al.*, 1988; Beheregaray *et al.*, 2002). Nesse sentido, durante o baixo nível do mar, regiões mais extensas da plataforma, forneceram áreas mais amplas para manutenção do fluxo gênico entre habitats estuarinos e de água doce, ao passo que

em regiões mais estreitas da plataforma, o fluxo gênico foi limitado (Thomaz *et al.*, 2015; Baggio *et al.*, 2017). Assim, possíveis isolamentos e/ou reconexões entre faunas aquáticas, com detecções de contato secundário, são tidos como grandes promotores para uma possível diversificação por pulso (Erwin, 1979, 1981, 1985; Halas *et al.*, 2005; Baggio *et al.*, 2017).

No Atlântico Ocidental, mais especificamente na América do Sul, a plataforma continental é extensa e heterogênea (Coutinho, 2005). As regiões Norte e Sul possuem as maiores extensões com 330 km e 380 km, respectivamente, enquanto as outras regiões têm aproximadamente 90 km. Com relação à profundidade, a região Sul é a maior (60m a 180m), enquanto o Norte apresenta profundidade média (75m a 80m) e o Nordeste do Brasil a menor (40m a 80m) (Coutinho, 2005; Goes & Ferreira Jr., 2011; Vital *et al.*, 2010). Devido a essa heterogeneidade, essa plataforma continental foi exposta de forma variada durante os ciclos glaciais, permitindo contato e/ou isolamento entre organismos de diferentes habitats aquáticos, podendo ter promovido a diversificação ou estruturação populacional das espécies nesses ambientes estuarinos e costeiros (Baggio *et al.*, 2017). Além disso, durante os períodos glaciais e interglaciais, ocorreram diferenças na temperatura da água, salinidade e nos sistemas de correntes marítimas, que podem ter contribuído para a diferenciação genética dos organismos marinhos (Bowen *et al.*, 2013; Gaggiotti *et al.*, 2009; White *et al.*, 2010). Nesse contexto, fatores históricos e ecológicos podem ter moldado essa diversidade na região do Atlântico Sul.

Nessa região, uma das famílias que se diversificaram na transição do ambiente marinho para o de água doce foi Engraulidae, ocorrida durante o Mioceno (Albert & Reis, 2011). Dentre os representantes da família, o gênero *Lycengraulis* se destaca, por apresentar espécies em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce (Mai & Vieira, 2013). Atualmente, o gênero apresenta quatro espécies válidas: *L. batesii* (Gunther, 1868), *L. figuereidoi* (Loeb & Alcântara, 2013), *L. grossidens* (Spix & Agassiz, 1829) e *L. poeyi* (Kner, 1863). *Lycengraulis batesii* e *L. figuereidoi* são espécies de água doce, com ocorrência na bacia Amazônica, já *L. grossidens* e *L. poeyi* são espécies de ampla distribuição em regiões marinhas, com *L. poeyi* ocorrendo na costa do Pacífico e *L. grossidens* ocorrendo ao longo da costa leste da

América do Sul (Mai & Vieira, 2013).

Lycengraulis grossidens é uma espécie diádroma que se distribui de Belize à Argentina, em drenagens costeiras da América do Sul (Whitehead *et al.*, 1988). Possui uma alta vagilidade e plasticidade no uso múltiplo do habitat, apresentando populações de água doce, estuarinas e marinhas (Mai & Vieira, 2013; Fricke *et al.*, 2022). Esse táxon parece ser capaz de reproduzir-se tanto em ambientes de água doce, quanto estuarinos, entretanto, não há registro de desova no ambiente marinho (Mai & Vieira, 2013). Alguns registros populacionais têm sido documentados para essa espécie no Atlântico Sul, com populações residentes estuarinas e residentes de água doce ao longo da sua distribuição, bem como populações que migram para algumas bacias, como tem sido documentado no Amazonas, Orinoco, Paraná e Parnaíba (Fuster de Plaza & Boschi, 1961; Whitehead *et al.*, 1988; Kullander & Ferraris, 2003; Mai *et al.*, 2012; Mai & Vieira, 2013; Fricke *et al.*, 2022).

Análises morfológicas baseadas em informações merísticas e de otólitos têm apontado para a presença de quatro populações na costa brasileira: sendo uma ocorrendo no Pará, outra com indivíduos distribuídos entre os estados do Ceará e Espírito Santo, outra entre o Rio de Janeiro e São Paulo e a última entre Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Silva, 2006). Já o estudo de genética de populações realizado por Mai *et al.* (2016), na porção sul do Brasil, identificou duas populações distintas da espécie, uma residente de água doce, ocorrendo na bacia do rio Uruguai, e uma outra estuarina/marinha residente ao longo da costa do Sul do Brasil. Além da diversidade no uso múltiplo do habitat e das diferenciações morfológicas e genéticas até agora detectadas, muitas controvérsias ainda se perpetuam sobre esse táxon, como, por exemplo, seus modos de vida e recrutamento (Mai & Vieira, 2013), além da diversidade genética ao longo de toda a sua distribuição (Mai *et al.*, 2016). Por ser uma espécie costeira, com grande capacidade de adentrar em ambientes estuarinos e de água doce em épocas reprodutivas, esse táxon se torna um modelo ideal para avaliar a sua diversidade genética e coesão evolutiva ao longo da sua distribuição.

No presente trabalho, avaliamos a diversidade genética e filogenética de *L. grossidens*, visando abordar as seguintes questões: Existem diferentes linhagens genéticas ao longo de toda sua distribuição? O fluxo gênico das populações de água

doce são restritos, se comparados a população do litoral conforme registrado anteriormente por Mai *et al.* (2016)? Qual o papel histórico das oscilações do nível do mar na diversificação das populações de *L. grossidens*?

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo

Foram obtidas 40 amostras de tecidos de peixes da coleção ictiológica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 14 amostras da coleção de tecidos do Instituto de Biociências/UNESP - Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Botucatu-SP e 7 amostras da coleção ictiológica de tecidos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (para mais informações detalhadas acessar a tabela suplementar). Além disso, foram coletados 40 indivíduos na região do baixo rio São Francisco (Penedo-AL) e na sua foz (Piaçabuçu-AL). Os espécimes coletados em Penedo e Piaçabuçu foram obtidos com rede de arrasto, sendo posteriormente levados para o Laboratório de Ictiologia e Conservação da Universidade Federal de Alagoas em Penedo - AL para serem extraídas amostras de tecido muscular ou de nadadeiras, as quais foram posteriormente conservadas em etanol 100%. Para complementar nossas amostras, acessamos 18 sequências georreferenciadas de COI depositadas na plataforma Bold Systems. No total, foram obtidas 119 amostras de COI ao longo da distribuição de *L. grossidens*, provenientes de diferentes habitats (Figura 1): 47 marinhas, 44 estuarinas e 28 dulcícolas. Adicionalmente, foram obtidas sequências do gene nuclear Rodopsina de um subconjunto de 13 amostras que representavam os filogrupos identificados com base nos resultados do mtDNA.

3.2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Os procedimentos de extração do DNA genômico total dos tecidos foram realizados utilizando o Kit Promega® (Wizard® Genomic DNA Purification Kit), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. Do material extraído foi realizada a quantificação por pares de base (pb), através de visualização em gel de agarose a 0,8%, ou a concentração no espectrofotômetro, levando em consideração valores entre 10 e 20 ng/ul para o mitocondrial e valores a partir de 50 ng/ul para o nuclear. Em seguida foram amplificados fragmentos de DNA mitocondrial

(COI) utilizando os primers FishF1 e FishR1, FishF2 e FishR2 (Ward *et al.*, 2005), e fragmentos do DNA nuclear (Rhod) utilizando os primers Rod-F2w e Rod-R4n (Sevilla *et al.*, 2007). O volume final do MIX para a PCR do gene mitocondrial foi de 15 μ l, sendo: 8,5 μ l de H₂O milliQ, 2,4 μ l de dNTPs, 1,5 μ l de tampão 1X de polimerase Platinum Taq (Invitrogen), 0,6 μ l de MgCl₂, 0,6 μ l de cada primer, 0,12 μ l de Taq Polimerase e 0,6 μ l de DNA molde. Quando necessário, o MIX foi suplementado com 1 μ l de BSA a 1 μ g/ μ L, sendo descontado 1 μ l de H₂O milliQ para continuar com o volume final de 15 μ l. Para a PCR do gene nuclear o volume final foi de 25 μ l, sendo: 20,8 μ l de PCR Master Mix (Promega®), 1 μ l de cada primer (10 mM), 0,2 μ l de 1U Taq Polimerase e 2 μ l de DNA molde. As condições de amplificação seguiram uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 5 min, depois 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, temperatura de anelamento por 30 s (ver abaixo) e 72°C por 35 s, extensão a 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 7 min e 20°C por 2 min. As temperaturas de anelamento foram as seguintes: 55-57°C para o COI e 56°C para a Rhod.

Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo de precipitação com polietilenoglicol 20% (PEG) (Sambrook *et al.*, 1989) e direcionados para o sequenciamento, usando a mesma amplificação dos primers no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz em Salvador-BA.

3.2.3 Análise dos dados

As sequências foram editadas no software Geneious (Kearse *et al.*, 2012), onde também foram alinhadas através do método Clustal Omega. Para o gene nuclear Rodopsina os sítios heterozigotos foram codificados com base no código da IUPAC. Posteriormente, foi utilizado o algoritmo PHASE (Stephens *et al.*, 2001) pelo DnaSP v 6.0 (Rozas *et al.*, 2017) para obtenção da fase gamética dos indivíduos. O número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), número de sítios polimórficos (Nsp) e diversidade nucleotídica (π) foram obtidos através do software DnaSP v 6.0 (Rozas *et al.*, 2017). Foram obtidas redes de haplótipos para cada gene no software Pop Art (Leigh & Bryant, 2015).

Uma reconstrução filogenética foi realizada com o gene COI, incluindo todas as amostras de *L. grossidens*, e sequências de *L. batesii* (Günther, 1868) como grupo

externo, por meio de Inferência Bayesiana (BI) no software MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) no CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). Foi utilizado o modelo evolutivo GTR+I+G, conforme estimado pelo MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004), com base no critério de informação de Akaike (AIC). Foram implementadas duas corridas independentes com 10 milhões de gerações, amostrando a cada 1.000 árvores. A convergência das cadeias de Markov foi inspecionada visualmente no Tracer 1.6 (Drummond *et al.*, 2012), atestando que todos os valores de ESS estivessem acima de 200. Descartamos os primeiros 25% das gerações (*burn-in*), combinando as árvores restantes para obter uma árvore consenso, a qual foi visualizada no FigTree v1.4.1 (Rambaut, 2009).

Adicionalmente, foram utilizados métodos de delimitação para avaliar a existência de linhagens crípticas, um método de distância, o *Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP)* (Puillandre *et al.*, 2021) e um método filogenético, o Modelo *General Mixed Yule-Coalescent (GMYC)* (Pons *et al.*, 2006), para o qual foram utilizadas as árvores ultramétricas gerada no BEAST 1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007) com o modelo *Yule Speciation prior*, enquanto para o ASAP utilizamos o alinhamento do COI e o modelo evolutivo Kimura (K80) ts/tv 2.0.

Uma análise de estrutura populacional espacial de *L. grossidens* com base no gene COI foi implementada no pacote Geneland 4.9.2 (Guillot *et al.*, 2005). Esta análise de estrutura populacional bayesiana utiliza um algoritmo de agrupamento a partir de uma matriz de genótipos, para explorar a atribuição individual sob um modelo, e recupera a melhor configuração de grupos genéticos que minimiza o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guillot, Santos & Estoup, 2008; Pritchard *et al.*, 2000). Executamos 500.000 iterações de Cadeia Markov Monte Carlo (MCMC), amostrando a cada 500 passos, com um *burn-in* de 10%, avaliando a probabilidade de agrupamento de $k=1-5$. A partir do resultado da distribuição posterior, confeccionamos um mapa de isoclinas de probabilidade de arranjo populacional para cada população ou *cluster*. Além disso, implementamos para o COI uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para verificação da estruturação entre populações com o software Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Nessa análise, somente localidades com duas ou mais amostras foram utilizadas. A

significância estatística da análise foi obtida com 1.000 permutações.

Para estimar os tempos de divergência entre as linhagens, combinamos informações de todas as árvores dos genes COI e Rhod em uma única árvore, implementando uma abordagem Bayesiana de coalescência multiespécies, usando o método árvore de espécies no BEAST 2.6.3 (Drummond *et al.*, 2012). Para isso, geramos o arquivo de entrada no BEAUTi, considerando os dois marcadores. As linhagens de mtDNA foram consideradas como possíveis espécies na análise. O modelo de melhor ajuste para cada *locus* foi estimado pelo MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004): COI – GTR+I e Rhod – HKY+G. Como não existem fósseis disponíveis para o grupo, usamos a taxa de substituição para o COI de 0.01 mutação/sítio/milhão ano (Thomaz *et al.*, 2015) e para a Rhod foi estimado pelo BEAST, usando um prior exponencial default com o *prior strict clock*. Realizamos duas corridas independentes com 100 milhões de gerações de MCMC cada, amostrando a cada 10.000 gerações e usando 10% de *burn-in*. Verificamos a convergência entre as execuções usando o Tracer v1.6, garantindo que os valores de ESS fossem superiores a 200 para todos os parâmetros. As árvores resultantes foram combinados, usando TreeAnnotator. Visualizamos a árvore de consenso e as árvores amostradas posteriormente no DensiTree 2.2.1 (Bouckaert & Heled, 2014).

Realizamos uma análise para avaliar o tamanho efetivo populacional ao longo do tempo, com base nos *loci* nuclear e mitocondrial utilizando o *Extended Bayesian Skyline plot* (EBSP), no BEAST 2.6.3 (Drummond *et al.*, 2012; Bouckaert *et al.*, 2014) para cada um dos grupos mitocondriais aferidos. Para isso, foi criado um arquivo de entrada no BEAUTi, onde foi definido o modelo de substituição HKY para os dois genes. A taxa de mutação foi a mesma aplicada na inferência da árvore de espécies. Logo após foi selecionado um número de 100.000.000 de cadeias de Markov (MCMC), amostradas a cada 10.000 gerações e com um *burn-in* de 10%. A visualização das convergências das cadeias de Markov foi feita no *Tracer 1.6* (Drummond *et al.*, 2012). Todos os valores visualizados tiveram o ESS > 200. Os gráficos do EBSP foram plotados utilizando o script EBSP plot no R.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Diversidade Genética, Análises Filogenética e Delimitação de Espécie

No total, foram obtidas 119 sequências de *L. grossidens* para o gene COI (550 pb) e 13 amostras para o gene Rhod (391 pb). Para o gene COI foram detectados 36 sítios polimórficos, distribuídos em 23 haplótipos ($Hd= 0.874$ e $\pi= 0.015$). Enquanto para a Rodopsina, foram detectados 8 sítios polimórficos distribuídos em 5 haplótipos ($Hd= 0.808$ e $\pi= 0.0097$). A rede de haplótipos com dados de mtDNA recuperou três haplogrupos, sendo eles: (01) grupo **A** com indivíduos continentais de água doce, estuarinos e marinhos distribuídos de Santa Catarina até a Argentina (SUL), o grupo **B** com indivíduos estuarinos e de água doce exclusivamente do Rio São Francisco (RSF) e o outro grupo **C** com indivíduos marinhos distribuídos do Pará até São Paulo, que se encontram em simpatria com indivíduos do estuário do Rio São Francisco (COSTA) (Figura 1). A rede de haplótipos do gene nuclear recuperou parcialmente a estrutura do mitocondrial, pois recuperou compartilhamento de haplótipos entre os grupos COSTA e RSF (Figura 1).

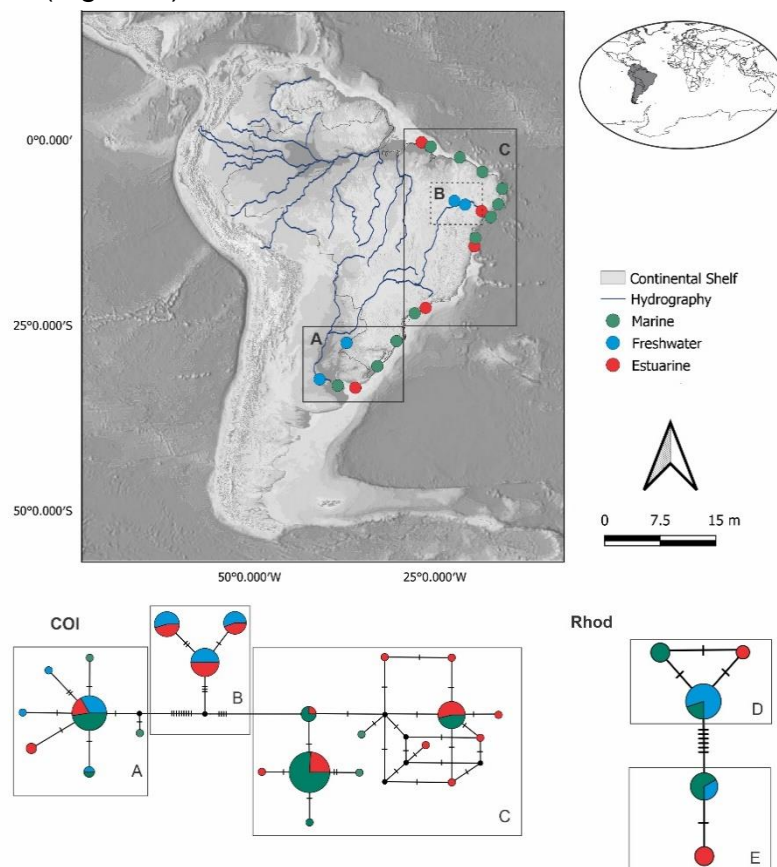


Figura 1. Mapa das localidades das amostras de *L. grossidens* ao longo da costa da América do Sul. À direita: Rede de haplótipos com o gene COI; o grupo A refere-se ao haplogrupo SUL, o grupo B ao RSF e o grupo C ao haplogrupo do COSTA. À esquerda: Rede de haplótipos da região nuclear Rhod; o grupo D reúne os indivíduos da COSTA e RSF, e o grupo E reúne indivíduos do SUL. Os traços entre os haplótipos representam os passos de mutações.

A reconstrução filogenética baseada em dados de mtDNA corroborou os resultados evidenciados pela rede de haplótipos, apontando para a presença de três clados bem suportados: (1) Clado COSTA, (2) Clado RSF e (3) Clado SUL (Figura 2). Com relação aos métodos de delimitação de espécie, os dois apontaram para a presença de três linhagens distintas ao longo da distribuição de *L. grossidens* na América do Sul.

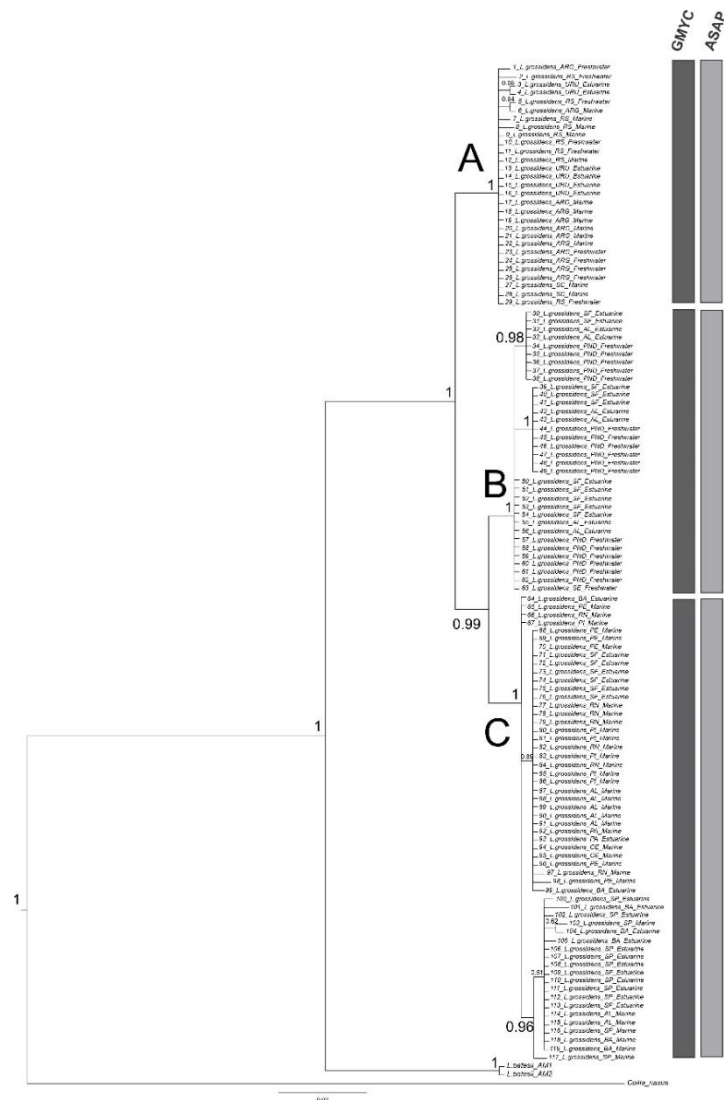


Figura 2. Topologia obtida por inferência Bayesiana baseada em mtDNA. Os números nos nós representam valores de probabilidade posteriores. As letras **A**, **B** e **C** representam o agrupamento das linhagens, sendo o grupo A referente aos indivíduos do haplogrupo SUL, o grupo B aos indivíduos do haplogrupo RSF e o grupo C indivíduos do haplogrupo COSTA.

A análise de estrutura genética espacial (Figura 3) recuperou três grupos genéticos ao longo da distribuição da espécie, com probabilidade de assinalamento dos indivíduos em cada umas das populações de 0,66. Um primeiro agrupamento (Fig. 3A) reuniu indivíduos continentais e marinhos localizados mais ao sul, representados pelas localidades de Santa Catarina até o norte da Argentina. O segundo agrupamento (Fig. 3B) alocou indivíduos marinhos, representando localidades do Norte do Brasil até o estado de São Paulo, e o terceiro agrupou indivíduos de água doce e estuarinos coletados estritamente no Rio São Francisco (Fig. 3C).

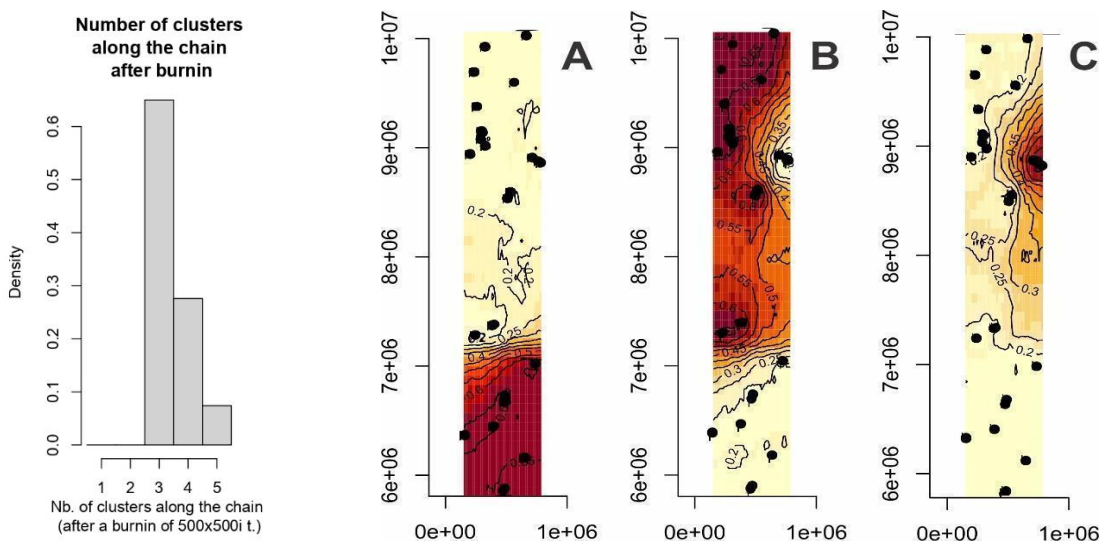


Figura 3. Estrutura genética populacional espacial de *L. grossidens* obtida pelo Geneland. À esquerda, gráfico com a densidade da verossimilhança marginal para cada k . Nos mapas, os pontos pretos representam as localidades amostradas, e as cores indicam a probabilidade de pertencer ao cluster inferido, sendo o vermelho maior probabilidade e o amarelo menor probabilidade: (A) grupo SUL, com localidades de Santa Catarina ao Norte da Argentina, (B) grupo COSTA, com localidades ao longo da costa e (C) grupo RSF com localidades no Rio São Francisco. Os números no eixo x indicam as coordenadas de latitude e no eixo y as coordenadas de longitude.

Os resultados da AMOVA com base nos dados de mtDNA foram utilizados para determinar os níveis de estruturação genética em *L. grossidens*. Os resultados obtidos indicaram a existência de diferenciação genética, com maior variabilidade genética entre os grupos (80.39%) do que dentro das localidades (14.54%) (Tabela 1).

Tabela 1. Análises de variância molecular (AMOVA) em *L. grossidens*.

Source of variation	D.F	Variance componentes	Variation %		ϕ
Among groups	2	4.88899 Va	80.39	ϕ_{CT}	0.80390
Among localites within groups	15	0.30839 Vb	5.07	ϕ_{ST}	0.85461
Within localites	94	0.88419 Vc	14.54		
Total	111	6.08157			

3.3.2 Árvore multiespécie e Tempo de divergência

A árvore de multiespécies mostrou relações semelhantes às recuperadas na filogenia do mtDNA, com forte suporte para os nós (Figura 4). A estimativa do tempo de divergência indicou que a divisão inicial para as linhagens de *L. grossidens* (SUL divergindo das demais) foi há cerca de 400 mil anos e a divergência mais recente entre RSF e COSTA foi datada de 77 mil anos atrás (Figura 4).

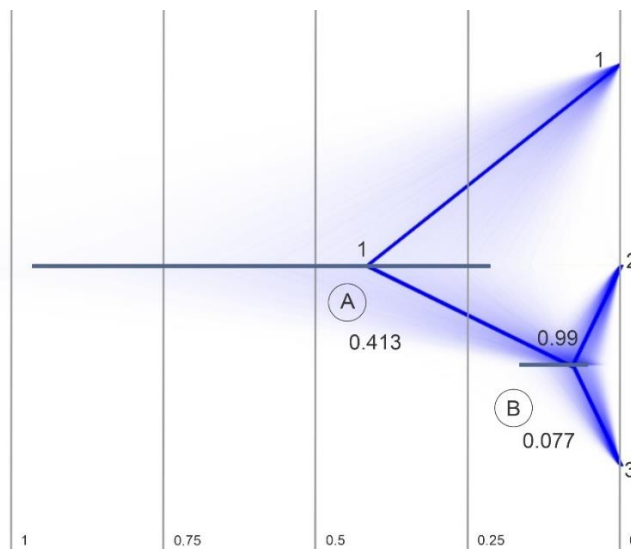


Figura 4. Cronograma da árvore coalescente multiespécies a partir dos conjuntos de dados mitocondriais e nucleares: A (SUL-1) e B (COSTA-2 e RSF-3). Os números nos nós representam alta densidade posterior e as linhas cinzas os tempos de divergência (ka) entre os clados. Linhas esmaecidas representam cada árvore amostrada, enquanto a árvore de consenso é representada pela linha azul grossa.

3.3.3 Demografia histórica

O *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) (Figura 5) revelou sinal de expansão populacional no final do Pleistoceno em todos grupos de *L. grossidens*.

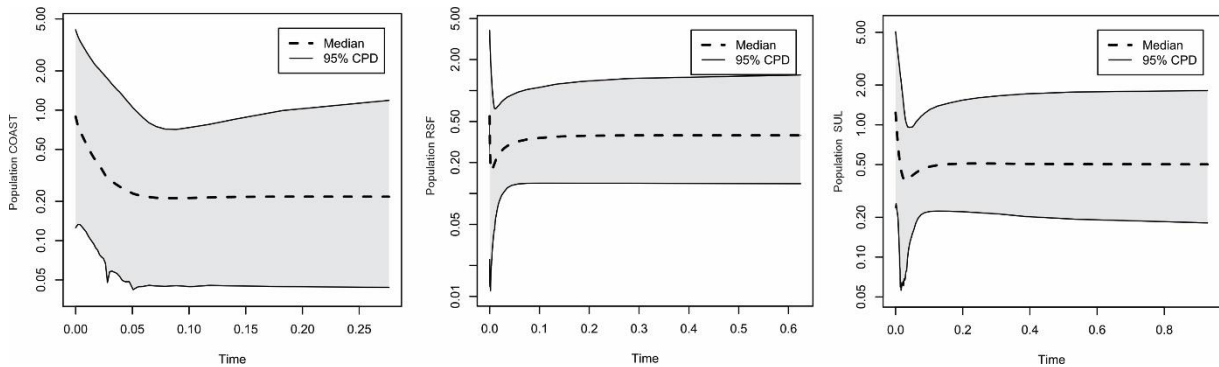


Figura 5. Extended Bayesian skyline plot. Indicação das mudanças estimadas no tamanho populacional efetivo sobre o tempo das populações de *L. grossidens*. A linha tracejada representa a estimativa mediana, enquanto as marcações em cinza representam os intervalos 95% highest-posterior-density (HPD). A primeira refere-se à população da COSTA, a segunda à população do RSF e a última à população do SUL.

3.4 DISCUSSÃO

Barreiras ao fluxo gênico desempenham um papel fundamental na dinâmica da genética de populações, promovendo diferenciação genética e estruturação filogeográfica (Avice, 2000). Nesse contexto, é extremamente importante conhecer os processos atuais e históricos que moldam essa variação, uma vez que essas informações auxiliam na gestão dos recursos genéticos naturais. As nossas análises filogeográficas foram congruentes, conseguindo discriminar efetivamente a presença de três linhagens de *L. grossidens*, distribuídos no Atlântico Ocidental. No geral, foi possível observar uma linhagem costeira de ampla distribuição do norte ao sudeste do Brasil (COSTA), uma outra linhagem na região sul da costa brasileira ao norte da Argentina (SUL), e uma mais restrita com ocorrência na região do baixo rio São Francisco, no nordeste do Brasil (RSF). Interessantemente, foi detectado

representantes da linhagem da COSTA e RSF em simpatria na foz do rio São Francisco.

As estimativas de tempo de divergência apontam para uma diversificação recente, que ocorreu durante as flutuações climáticas no Pleistoceno, e que a distribuição atual pode ser fruto de um possível contato secundário entre as populações do RSF e COSTA. Em ambientes marinhos, muitas são as possibilidades de restrição ao fluxo gênico, seja por distância geográfica, por diferença de salinidade e temperatura, ou até mesmo por efeitos provocados por processos históricos, como as mudanças climáticas nas eras glaciais (Cowen *et al.*, 2000). Estes processos podem restringir o fluxo gênico, levando a uma divergência parcial ou total entre populações (Gaither *et al.*, 2011). Um outro fator que pode também moldar essas diferenciações populacionais, pode ser a extensão da plataforma continental, visto que plataformas menores limitaram a manutenção do fluxo gênico no Pleistoceno (Thomaz *et al.*, 2015). Enquanto em plataformas maiores, os seus efeitos foram contrários, promovendo a conectividade entre as populações marinhas (Baggio *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2016), verificou que à plataforma continental do nordeste brasileiro serviu como barreira à dispersão entre populações de *Bagre bagre* (Ariidae), devido a ser extremamente curta, quando comparada às outras regiões da América do Sul. Esta maior exposição, limitou a dispersão de suas populações. Do mesmo modo, um estudo filogeográfico entre as populações de *Atherinella brasiliensis* (Atherinopsidae), nos estuários do nordeste ao sul do Brasil, realizado por Baggio *et al.* (2017), verificaram que bacias da região costeira do nordeste brasileiro permaneceram isoladas durante os períodos de baixo nível do mar, promovendo maior diferenciação genética. Nesse caso, o isolamento durante os máximos glaciais e posterior contato

secundário parece também ter atuado nas populações de *L. grossidens*, principalmente no nordeste do Brasil.

As análises do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo, detectaram expansão populacional nas três linhagens de *L. grossidens* no final do Pleistoceno. Estudos demográficos em peixes tem revelado uma estreita relação desses eventos com processos históricos, como, por exemplo, relacionados aos períodos de glaciações do Quaternário (Silva *et al.*, 2016). Quando as regressões do nível do mar chegaram a cerca de 130 m abaixo do nível atual em algumas regiões da América do Sul, estas culminaram em uma perda significativa de habitat e, conseqüentemente, restrições ao fluxo gênico (Fairbanks, 1989; Fauvelot *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016). Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela devido ao largo intervalo de confiança nas nossas análises.

O tempo de divergência segundo as nossas análises entre as linhagens da COSTA e do RSF é recente, aproximadamente 77 mil anos. Esse período coincide com pelo menos dois eventos de Máximos Glaciais, quando o mar recuou e expôs cerca de 92% da plataforma continental (Ludt & Rocha, 2015), podendo indivíduos da população da costa terem ficado isolados em regiões do rio São Francisco e posteriormente terem sido reconectados. Durante o Pleistoceno, a foz do rio São Francisco mudou de curso, possivelmente, podendo ter gerado um novo habitat, que pode ter levado representantes do clado do RSF a se diferenciar. Uma pequena mudança na foz do RSF foi documentada no passado, por estudos geomorfológicos, que verificaram que anteriormente o RSF drenava para algumas bacias costeiras, como o Itapicuru (BA) ou rio Vaza-Barris (SE) (Kinh, 1957; Mescolotti, 2021). Da mesma forma, os pequenos deslocamentos causados pelo abandono dos vales do rio

Vaza-Barris/Itapicuru até a posição atual, poderiam também ter moldado geneticamente os habitantes que viviam em sua foz, gerando os padrões genéticos de *L. grossidens* aqui detectados. A conectividade histórica da foz dos rios ou o seu isolamento pode ter propiciado conexões genéticas em plataformas continentais maiores e isolamento em plataformas menores, ocasionando estruturação e posterior contato secundário (Dias *et al.* 2014, Albert *et al.*, 2017). Este último cenário parece ser o mais plausível para explicar essa população restrita e mais estruturada no baixo rio São Francisco, que diverge geneticamente da população do litoral em 1.7%, como apontado em um estudo anterior realizado para a família Engraulidae (Vicente *et al.*, 2020). Ademais, poderíamos levantar a hipótese de que a mudança do curso do rio São Francisco, em sua foz, pode ter funcionado como uma barreira temporária, conduzindo a divergência populacional dessa linhagem. Processos como esses já foram detectados em outros estudos para diferentes organismos (Lanna *et al.*, 2020; Thomé *et al.*, 2021). Por outro lado, a população costeira e mais amplamente distribuída pode ser explicada pela ação da corrente sul equatorial ou brasileira, que tem a capacidade de proporcionar uma alta dispersão larval ou a migração de adultos, gerando uma alta conectividade genética das espécies com ocorrência nessa região, conhecida como província Brasileira (Eble *et al.*, 2011; Luiz *et al.*, 2012; Wieman *et al.*, 2014).

A linhagem SUL foi a primeira a divergir das demais, há cerca de 400 mil anos, antes da separação da população da COSTA e do RSF. Nessa região a plataforma continental é maior, o que pode ter propiciado uma manutenção ao fluxo gênico, evitando uma fragmentação de populações na região Sul. Essa linhagem encontra-se dentro da província Argentina, marcada por águas mais frias (Briggs & Bowen,

2012; Cord *et al.*, 2022). Nessa província, pode ser observado o encontro das correntes das Malvinas com a corrente Brasileira, formando uma clina térmica, que pode ter gerado um local de quebra filogeográfica entre essas populações, como tem sido reportado em outros estudos (Peterson & Stramma, 1991; Beheregaray & Levy, 2000; Rodrigues *et al.*, 2014). Na região de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul existe um sistema dinâmico com vários estuários, intercalados com áreas de mar aberto, com diferenças de salinidade e temperatura. Estes fatores ecológicos podem estar atuando como uma barreira ao fluxo gênico da população mais ao Sul com a linhagem de ampla distribuição com ocorrência na província brasileira (Briggs & Bowen, 2012). Esta quebra ao fluxo gênico tem sido documentada em algumas espécies de peixes (Beheregaray & Levy, 2000; Rodrigues *et al.*, 2014) e crustáceos, nessa zona de transição de águas mais quentes com águas mais frias (Weber & Levy, 2000). Estudos com essas abordagens, avaliando representantes de Engraulidae no Atlântico Norte, tem reportado diferenciações populacionais relacionados à temperatura da água (Silva *et al.*, 2014). Além disso, outros processos ecológicos relacionados às diferenças de salinidade, principalmente entre populações que transitam entre ambientes marinhos e de água doce (Nynatten, 2015), também já foram documentados para essa mesma espécie (Mai *et al.*, 2016).

Considerações Finais

Nossos dados revelaram a presença de três linhagens enigmáticas de *L. grossidens* ao longo da distribuição da espécie na América do Sul. Nesse cenário, destacamos os efeitos climáticos no Pleistoceno, que moldaram essa diversidade ao longo da sua distribuição, gerando possíveis rupturas genéticas e contatos secundários. A heterogeneidade da plataforma continental parece ter moldado essa diversidade, principalmente na costa Nordeste, gerando vicariância e uma posterior dispersão. Além dos processos históricos, fatores ecológicos podem ter isolado a linhagem do Sul da outra linhagem de ampla distribuição na costa do Brasil, possivelmente atrelados aos efeitos da temperatura da água. Todas essas informações destacam as rotas evolutivas que *L. grossidens* experimentou durante o Pleistoceno, que culminaram em assinaturas genéticas profundas ao longo de sua distribuição. Nesse contexto, sugerimos para estudos futuros, abordagens integrativas, incluindo análises morfológicas e genômicas para avaliar o status taxonômico dessas linhagens e seus níveis de expressão gênica em diferentes habitats.

Referências

- Albert, J. S., Petry, P. & Reis, R. E. T. (2011). Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. **University of California Press**. p. 21-58.
- Albert, J. S., Schoolmaster, D. R., Jr, V. T., & Duke-Sylvester, S. M. (2017). Barrier displacement on a neutral landscape: toward a theory of continental biogeography. **Systematic Biology**, 66(2), 167–182.
- Avise, J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts: **Harvard University Press**.
- Baggio, R. A., Stoiev, S. B., Spach, H. L. & Boeger, W. A. (2017). “Opportunity and Taxon Pulse: The Central Influence of Coastal Geomorphology on Genetic Diversification and Endemism of Strict Estuarine Species.” **Journal of Biogeography** 44(7): 1626–39.
- Beheregaray, L. B. & Levy, J. A. (2000). Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. **Copeia**, v. 2000, n. 2, p. 441-447.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P. & Briscoe, D.A. (2002). A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceeding of the Royal Society of London B**, 269: 65-73.
- Bloom, D. D. & N.R. Lovejoy. (2014). The evolutionary origins of diadromy inferred from a time-calibrated phylogeny for Clupeiformes (herring and allies). **Proceedings of the Royal Society B**, 281: 1 8.
- Bloom, D.D. & Lovejoy, N.R. (2012). Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). **Journal of Evolutionary Biology**, 25: 701 715.
- Bowen, B. W., Rocha, L. A., Toonen, R. J., & Karl, S. A. (2013). The origins of tropical marine biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, 28(6), 359–366.
- Briggs, J. C. & Bowen, B. W. (2012). A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. **Journal of Biogeography**, 39(1), 12–30.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. (1998). Biogeography. 2nd Ed. Sunderland, Massachusetts (**Sinauer Associates, Inc. Publishers**). — 691 S.
- Bouckaert, R. & Heled, J. (2014). DensiTree 2: Seeing Trees Through the Forest. **bioRxiv** 012401.
- Clark, P.U., Dyke, A.S., Shakun, J.D., Carlson, A.E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J.X., Hostetler, S.W. & McCabe, A.M. (2009). The Last Glacial Maximum. **Science**, 325, 710– 714.
- Cooke, G. M., Chao, N. L., & Beheregaray, L. B. (2012). Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). **Journal of Biogeography**, 39(4), 724-738.
- Cord, I., Nunes, L. T., Barroso, C. X., Freire, A. S., Gadig, O. B., Gomes, P. B., ... & Floeter, S. R. (2022). Brazilian marine biogeography: a multi-taxa approach for outlining sectorization. **Marine Biology**, 169(5), 1-13.
- Cowen, R.K., Lwiza, K.M., Sponaugle, S., Paris, C.B. & Olson, D.B. (2000) Connectivity of marine populations: open or closed? **Science**. Feb 4;287(5454):857-9.

- Coutinho, P. N. (2005). Levantamento do estado da arte da pesquisa dos recursos vivos marinhos. Oceanografia Geológica. **PROGRAMA REVIZEE. FEMAR/SECIRM**, Brasília.
- Dias, M. S. *et al.* (2014). "Global Imprint of Historical Connectivity on Freshwater Fish Biodiversity." **Ecology Letters** 17(9): 1130–40.
- DiBattista, J. D. *et al.* (2013). After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. **Journal Biogeography**.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol. Biol.**
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut. (2012). A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol. Biol. Evol.**
- Eble, J. A. *et al.* (2011). Not all larvae stay close to home: insights into marine population connectivity with a focus on the brown surgeonfish (*Acanthurus nigrofuscus*). **Journal of Marine Biology**, v. 2011.
- Erwin, T. L. (1979). Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. In **Carabid beetles – their evolution, natural history, and classification** (Erwin, T. L., Ball, G. E. & Whitehead, D. R. eds), pp 539–592. W. Junk, The Hague.
- Erwin, T. L. (1981). Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. **Vicariance biogeography – a critique (Ed.)** Nelson, G. & Rosen, D. E. New York, Columbia University Press.
- Erwin, T. L. (1985). The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. **Taxonomy, phylogeny, and zoogeography of beetles and ants (Ed.)** G.E. Ball, G.E. W. Junk, Dordrecht.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131:479–491.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (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.
- Fairbanks, R.G.(1989). A 17,000 year glacio-eustatic sea-level record: influence of glacial melting rates on the Younger Dryas event and deep-ocean circulation. **Nature**, 342, 637– 642.
- Fauvelot, C., Bernardi, G. & Planes, S. (2003). Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. **Evolution**, v. 57, n. 7, p. 1571-1583.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Van der Laan, R. (eds) (2022). **Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References**.
- Fuster De Plaza, M. L. & Boschi, E. E. (1961). Áreas de inmigración y ecología de la anchoa *Lycengraulis olidus* (Günther) en aguas argentinas (Pisces, Engraulidae). Fac. Cs. Exac. Y Nat., Contrib. Cient., La Plata, Argentina, **Ser. Zool.**, 1(3): 127-183.
- Gaggiotti, O. E., Bekkevold, D., Jørgensen, H. B. H., Foll, M., Carvalho, G. R., Andre, C., & Ruzzante, D. E. (2009). Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. **Evolution**, 63(11), 2939–2951.

- Gaither, M.R., Bowen, B.W., Bordenave, T.R. *et al.* (2011). Phylogeography of the reef fish *Cephalopholis argus* (Epinephelidae) indicates Pleistocene isolation across the Indo-Pacific barrier with contemporary overlap in the coral triangle. **BMC Evol Biol** 11, 189.
- Goes, E. R., & Ferreira Jr, A. V. (2011). "Revista Brasileira de Geografia Física." **Revista Brasileira de Geografia Física** 06: 1275–91.
- Guilliot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). Geneland: um pacote de computador para genética da paisagem. **Notas Ecologia Molecular** 5 (3):712-715.
- Guilliot, G., Santos, F. & Estoup, A. (2008). Analisando dados de genética populacional georreferenciados com Geneland: um novo algoritmo para lidar com alelos nulos e uma interface gráfica amigável. **Bioinformática** 24 (11):1406-1407
- Halas, D., Zamparo, D. & Brooks, D.R. (2005). A historical biogeographical protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. **Journal of Biogeography**, 32, 249–260.
- Hubert, N. & Renno, J.F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436.
- Jacobina, U. P. *et al.* (2018). DNA barcode sheds light on systematics and Evolution of neotropical freshwater trahiras. **Springer Nature Switzerland**.
- Kearse, M., *et al.* (2012) Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. **Bioinformatics**, 28, 1647-1649.
- Kullander, S.O. & Ferraris, C.J Jr. (2003). Family Engraulidae, pp. 39-42. In: Reis, R.E.; Kullander e C.J. Ferraris Jr. (eds.). **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.
- Lanna, F.M. *et al.* (2020). Dwarf geckos and giant rivers: the role of the São Francisco River in the evolution of *Lygodactylus klugei* (Squamata: Gekkonidae) in the semi-arid Caatinga of north-eastern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 129, n. 1, p. 88-98.
- Leigh, J.W. & Bryant, D. (2015), popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods Ecol Evol**, 6: 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Loeb, M.V. & A.V. Alcântara. 2013. A new species of *Lycengraulis* Günther, 1868 (Clupeiformes: Engraulinae) from the Amazon basin, Brazil, with comments on *Lycengraulis batesii* (Günther, 1868). **Zootaxa**, 3693 (2): 200-206
- Lovejoy, N.R., Birmingham, E. & Martin, A.P. (1998). South American rays came in with the sea. **Nature**, 396:421-422.
- Lovejoy, N. R., Albert, J. S. & Crampton, W.G.R. (2006). "Miocene Marine Incursions and Marine/Freshwater Transitions: Evidence from Neotropical Fishes." **Journal of South American Earth Sciences**. 21(1–2): 5–13.
- Loydell, D. K. (2007). Early Silurian positive $\delta^{13}\text{C}$ excursions and their relationship to glaciations, sea-level changes and extinction events. **Geological Journal**, v. 42, n. 5, p. 531-546.
- Ludt, W. B. & Rocha, L. A. (2015). Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. **Journal of Biogeography**, 42: 25-38.
- Maggs, C.A., Castilho, R., Foltz, D., Henzler, C., Jolly, M.T., Kelly, J., Olsen, J., Perez, K.E., Stam, W., Väinölä, R., Viard, F. & Wares, J. (2008), Evaluating Signatures of Glacial Refugia for North Atlantic Benthic Marine Taxa. **Ecology**, 89: S108-S122.

- Mai, A.C.G. & Vieira, J. P. (2013). Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulididae). **Biota Neotropical**. ISSN 1676-0611. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300015>.
- Mai, A.C.G. & Vieira, J.P. (2013). Current knowledge of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Pisces, Clupeiformes, Engraulididae). **Biota Neotropica**, 13 (3): 1 10
- Mai, A.C.G., Robe, L.J., Martins, L.F. & Vieira, J.P.(2016). Genetic relationships between landlocked and coastal populations of *Lycengraulis grossidens* (Engraulidae): a biogeographic hypotheses of occurrence in the Paraná Basin. **Marine and Freshwater Research**, 67: 1 10.
- Mai, A.C.G., Condini, M.V., Albuquerque, C.Q., Loebmann, D., Saint'Pierre, T.D., Miekeley, N. & Vieira, J.P. (2014). High plasticity in habitat use of *Lycengraulis grossidens* (Clupeiformes, Engraulididae). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 141: 17 25.
- Mescolotti, Patricia Colombo *et al.* (2013). Fluvial aggradation and incision in the Brazilian tropical semi-arid: Climate-controlled landscape evolution of the São Francisco River. **Quaternary Science Reviews**, v. 263, p. 106977, 2021.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, 14 November 2010, p 1 – 8.
- Miralles, L., Juanes, F., Pardiñas, A. F. & Garcia-Vazquez, E. (2014). Paleoclimate shaped bluefish structure in the northern hemisphere. **Fisheries**, 39(12), 578-586.
- Nylander, J.A.A. (2004) MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author. **Evolutionary Biology Centre**, Uppsala University, Uppsala.
- Nynatten, A. V., Bloom, D., Chang, B. S. W. and Lovejoy, N. R.2015. Out of the blue: adaptive visual pigment evolution accompanies Amazon invasion. **Biology Letters**.
- Peterson, R. G. & Stramma, L. (1991). Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. **Prog. Oceanogr.** 26: 1-73.
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. & Vogler, A. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, 55,595–610.
- Potter, I.C., J.R. Tweedley, M. Elliott e A.K. Whitfield. 2015. The ways in which fish use estuaries: a refinement and expansion of the guild approach. **Fish and Fisheries**, 16: 230 239.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, 945-959.
- Puillandre, N., Brouillet, S. & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Mol. Ecol. Resour.** 21, 609–620.
- Rambaut, A., (2009). FigTree v1.3.1. Computer program available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- R Development Core Team (2012). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R **foundation for Statistical Computing**. <http://www.R-project.org/>
- Rodrigues, Rosa *et al.* (2014). DNA mitochondrial revela estruturação populacional em

- Macrodon atricauda (Perciformes: Sciaenidae): um estudo abrangendo toda a distribuição geográfica da espécie no Atlântico sudoeste. **DNA mitocondrial**, v. 25, n. 2, pág. 150-156.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, & J.P. Huelsenbeck. (2012). MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. **Syst. Biol.** 61:539-542.
- Rozas, J., Mata, A. F., DelBarrio, J. C. S., Rico, S. G., Librado, P., Onsins, S. R. & Gracia, A. S. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets, **Molecular Biology and Evolution**, Volume 34, Pages 3299–3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning – A Laboratory Manual. 2nd edn. **Cold Spring Harbor Press**, Cold Spring Harbor, New York (2.60-2.80).
- Sevilla, R.G., Diez, A., Norén, M., Mouchel, O., Jérôme, M. *et al.* (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology**. Notes, 7(5), 730-734.
- Silva, M.A. (2006). Variações morfo-merísticas da manjuba *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) ao longo da costa brasileira. **PhD Thesis**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 103 pp.
- Silva, W. C. *et al.* (2016). Early Pleistocene lineages of Bagre bagre (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of South America, with insights into the demography and biogeography of the species. **Neotropical Ichthyology** [online].
- Stephens, M., Smith, N. & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet** 68:978 – 989.
- Team, R.C. (2012). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria.
- Thomaz, A.T., Malabarba, L.R., Bonatto, S.L. & Knowles, L.L. (2015), Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **J. Biogeogr.**, 42: 2389-2401.
- Thomaz, A. T., & Knowles, L. L. (2018). Flowing into the Unknown: Inferred Paleodrainages for Studying the Ichthyofauna of Brazilian Coastal Rivers. **Neotropical Ichthyology** 16(3): 1–13.
- Thomé, M. T. C., Carstens, B. C., Rodrigues, M. T., Alexandrino, J., & Haddad, C. F. (2021). Genomic data from the Brazilian sibilator frog reveal contrasting pleistocene dynamics and regionalism in two South American dry biomes. **Journal of Biogeography**, 48(5), 1112-1123.
- Vicente, F. *et al.* (2020). Integrative systematics unveils the controversial identity of Engraulidae fishing stocks in a Neotropical estuary, northeast Brazil. **Neotropical Ichthyology** [online].
- Vital, H. *et al.* (2010). Characterization of the Brazilian Continental Shelf Adjacent to Rio Grande Do Norte State, Ne Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography** 58(SPEC. ISSUE 1): 43–54.
- Ward, R. D. *et al.* (2005). DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462):1847–57.

- Weber, L. I. & Levy, J. A. (2000). Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 420, n. 1, p. 203-210.
- Weitzman, S.H., N. A. Menezes. & Weitzman, M. J. (1988). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Pp. 379-427. In: Vanzolini, P.E. & W.R. Heyer (Eds.). **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Wieman, A.C., Berendzen, P.B., Hampton, K.R., Jang, J., Hopkins, M.J., Jurgenson, J. & Thurman, C. (2014). Um caranguejo panmítico da costa do Brasil? Impacto de correntes oceânicas divergentes e potencial de dispersão larval na variação genética e morfológica em *Uca maracoani*. **Marine Biology**, 161 (1), 173-185.
- White, C., Selkoe, K. A., Watson, J., Siegel, D. A., Zacherl, D. C., & Toonen, R. J. (2010). Ocean currents help explain population genetic structure. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 277(1688), 1685–1694.
- Whitehead, P.J.P., Nelson, G.J. & Wongratana, T.(1988). Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2 - Engraulidae. Rome, **FAO**.p.305 579. (FAO Fish Synopsis n. 125, v.7, pt. 2).

Material Suplementar

Tabela S1. Localidade e tipo de ambiente para amostras de amplificação para o COI

ESPÉCIE	LATITUDE	LONGITUDE	MUNICÍPIO/ESTADO	CODIGO	AMBIENTE	BOLD
<i>L. grossidens</i>	-30.17	-51.23	Barra do Ribeiro/RS	25536	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-23.82	-46.01	Bertioga/SP	40507	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-23.82	-46.01	Bertioga/SP	40584	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-9.97	-37.08	Gararu/SE	48779	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-3.74	-38.44	Fortaleza/CE	80276	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-3.74	-38.44	Fortaleza/CE	80277	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-26.99	-48.62	Balneário Camboriú/SC	73238	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-26.99	-48.62	Balneário Camboriú/SC	73239	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-7.77	-34.89	Itapissuma/PE	84723	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-0.80	-46.59	Bragança/PA	83666	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-9.68	-35.74	Maceio/AL	84909	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-9.68	-35.74	Maceio/AL	84910	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-13.36	-38.93	Valença/BA	90287	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-13.36	-38.93	Valença/BA	90286	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75336	-35.204	Natal/RN	4466_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75336	-35.204	Natal/RN	4467_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75336	-35.204	Natal/RN	4468_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75349	-35.203	Natal/RN	4748_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75349	-35.203	Natal/RN	4749_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75349	-35.203	Natal/RN	4750_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-5.75349	-35.203	Natal/RN	4751_RN	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-32.2074	-52.172	Rio Grande/RS	200 RS	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-32.2074	-52.172	Rio Grande/RS	201 RS	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-32.2074	-52.172	Rio Grande/RS	203 RS	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-32.2074	-52.172	Rio Grande/RS	204 RS	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	224 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	225 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	227 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	237 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	238 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	239 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	240 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	241 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-24.6827	-47.563	Iguape/SP	242 SP	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	452 PI	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	453 PI	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	454 PI	Marine	

<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	467 PI	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	472 PI	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-2.90762	-41.426	Cajueiro/PI	495 PI	Marine	
<i>L. grossidens</i>	0.13	-49.54	Belém/PA	555_PA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	642 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	643 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	644 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	645 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	646 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-34.7785	-55.396	Maldonado/URU	647 URU	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-29.7581	-57.103	Uruguaiana/RS	792 RS	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-29.7581	-57.103	Uruguaiana/RS	793 RS	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-29.7581	-57.103	Uruguaiana/RS	794 RS	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-29.7581	-57.103	Uruguaiana/RS	796 RS	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-12.8167	-38.717	Salvador/BA	826 BA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-12.8167	-38.717	Salvador/BA	831 BA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-12.8167	-38.717	Salvador/BA	834 BA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-12.8167	-38.717	Salvador/BA	838 BA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-12.8167	-38.717	Salvador/BA	842 BA	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-7.9	-34.8	Pau Amarelo/PE	952 PE	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-7.9	-34.8	Pau Amarelo/PE	953 PE	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-7.9	-34.8	Pau Amarelo/PE	954 PE	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-7.9	-34.8	Pau Amarelo/PE	956 PE	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-8.45	-34.917	Tamandaré/PE	963 PE	Marine	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_1_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_10_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_11_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_12_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_13_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_14_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_15_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_16_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_17_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_2_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_3_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_4_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_5_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_6_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_7_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_8_PND	Freshwater	
<i>L. grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_9_PND	Freshwater	

<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_21_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_27_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_28_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_30_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_31_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_32_AL	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_1	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_10	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_11	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_12	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_13	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_14	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_2	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_3	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_6	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF_7	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_15	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_17	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_19	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_4	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_5	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_8	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-10.4111	-36.433	Piaçabuçu/Foz/AL	U_SF1_9	Estuarine	
<i>L. grossidens</i>	-9	-34.59	Maceio/AL	B_1_AL	Marine	ANGBF34960-19
<i>L. grossidens</i>	-9	-34.59	Maceio/AL	B_2_AL	Marine	ANGBF34961-19
<i>L. grossidens</i>	-9	-34.59	Maceio/AL	B_3_AL	Marine	ANGBF34962-19
<i>L. grossidens</i>	-9	-34.59	Maceio/AL	B_4_AL	Marine	ANGBF34963-19
<i>L. grossidens</i>	-9	-34.59	Maceio/AL	B_5_AL	Marine	ANGBF34964-19
<i>L. grossidens</i>	-37.32	-57.19	Buenos Aires/ARG	B_1_ARG	Marine	FARG280-07
<i>L. grossidens</i>	-37.32	-57.19	Buenos Aires/ARG	B_2_ARG	Marine	FARG282-07
<i>L. grossidens</i>	-37.533	-57.317	Mch/ARG	B_3_ARG	Marine	FARG518-08
<i>L. grossidens</i>	-37.533	-57.317	Mch/ARG	B_4_ARG	Marine	FARG519-08
<i>L. grossidens</i>	-37.533	-57.317	Mch/ARG	B_5_ARG	Marine	FARG520-08
<i>L. grossidens</i>	-37.533	-57.317	Mch/ARG	B_6_ARG	Marine	FARG521-08
<i>L. grossidens</i>	-37.533	-57.317	Mch/ARG	B_7_ARG	Marine	FARG522-08
<i>L. grossidens</i>	-32.91	-60.675	Rosario/ARG	B_8_ARG	Freshwater	LARI101-12
<i>L. grossidens</i>	-32.91	-60.675	Rosario/ARG	B_9_ARG	Freshwater	LARI102-12
<i>L. grossidens</i>	-32.91	-60.675	Rosario/ARG	B_10_ARG	Freshwater	LARI103-12
<i>L. grossidens</i>	-32.86	-60.675	Rosario/ARG	B_11_ARG	Freshwater	LARI104-12
<i>L. grossidens</i>	-32.91	-60.675	Rosario/ARG	B_12_ARG	Freshwater	LARI105-12
<i>L. grossidens</i>	-23.863	-46.152	São João/SP	B_SP	Marine	MFSP349-10

Tabela S2. Localidade e tipo de ambiente para amostras de amplificação para Rodopsina

ESPÉCIE	LATITUDE	LONGITUDE	MUNICÍPIO/ESTADO	CODIGO	AMBIENTE
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-30.17	-51.23	Barra do Ribeiro/RS	25536	Freshwater
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-12.816667	-38.716667	Salvador/BA	842 BA	Estuarine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-13.36	-38.93	Valença/BA	90287	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-3.74	-38.44	Fortaleza/CE	80276	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-2.907617	-41.425999	Cajueiro/PI	467 PI	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_11_PND	Freshwater
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-10.29	-36.59	Penedo/AL	U_4_PND	Freshwater
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-5.753356	-35.203544	Natal/RN	4466_RN	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-32.2074	-52.171668	Rio Grande/RS	201 RS	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-26.99	-48.62	Balneário Camboriú/SC	73238	Marine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-9.97	-37.08	Gararu/SE	48779	Freshwater
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-34.778503	-55.396332	Maldonado/URU	646 URU	Estuarine
<i>Lycengraulis grossidens</i>	-34.778503	-55.396332	Maldonado/URU	642 URU	Estuarine