



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

João Eduardo Pereira de Freitas

Filogenia molecular e filogeografia de peixes da família Mullidae (Actinopterygii:  
Perciformes)

FORTALEZA

2015

JOÃO EDUARDO PEREIRA DE FREITAS

FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DE PEIXES DA FAMÍLIA  
MULLIDAE (ACTINOPTERYGII: PERCIFORMES)

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Marinhas.

Área de Concentração: Oceanografia

Orientador: Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

FORTALEZA

2015

Tito Monteiro da Cruz Lotufo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Rui Simões de Menezes

---

F936f Freitas, João Eduardo Pereira de.

Filogenia molecular e filogeografia de peixes da família Mullidae (Actinopterygii: Perciformes) / João Eduardo Pereira de Freitas - 2015.

84 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Profº. Drº. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

1. Peixes Recifais. 2. Peixe - Evolução. 3. Conectividade. . 4. Província brasileira. I. Título.

---

CDD 597.4

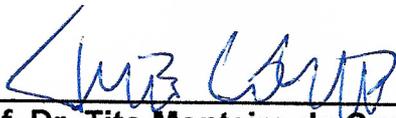
# JOÃO EDUARDO PEREIRA DE FREITAS

## “FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DE PEIXES DA FAMÍLIA MULLIDAE (ACTINOPTERYGII: PERCIFORMES)”

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR – Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de **DOUTOR** em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração em Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

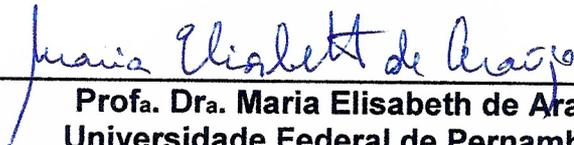
Aprovada em, 23 de fevereiro de 2015.

### BANCA EXAMINADORA



---

**Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)**  
Universidade de São Paulo  
Instituto Oceanográfico



---

**Prof. Dr. Maria Elisabeth de Araújo**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Oceanografia



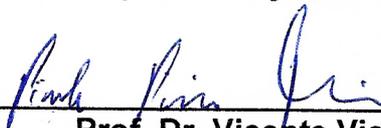
---

**Prof. Dr. Rodrigo Maggioni**  
Universidade Federal do Ceará  
Instituto de Ciências do Mar



---

**Prof. Dr. Simôni Santos da Silva**  
Universidade Federal do Pará  
Campus Avançado de Bragança



---

**Prof. Dr. Vicente Vieira Faria**  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Biologia

Tive bolsas da graduação ao doutorado, estudei em universidade pública e gratuita. Em síntese, sempre fui um assistido. Dedico este trabalho ao povo brasileiro que financiou minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Tito Lotufo pela paciência, ensinamentos, ajuda nas coletas e, acima de tudo, pela amizade;

À minha companheira Cristiane Xerez pelas indispensáveis contribuições no texto e por estar sempre ao meu lado “nas alegrias e nas tristezas”;

À minha mãe (Francilene Freitas) e tias (Dirlene Alencar e Irlés Alencar) que já foram homenageadas em outros momentos da minha formação acadêmica, essa conquista também é de vocês;

A Carolina Cerqueira por estar perto em um momento delicado da vida e pela ajuda fundamental nas coletas, obrigado, você é uma grande amiga;

A Andréa Oliveira e Raquel Almeida pelos ensinamentos em meu retorno à bancada de laboratório;

Ao professor Vicente Faria (UFC) pelos ensinamentos acadêmicos e pelos valiosos conselhos sobre a vida;

A Ronaldo Ruy pelo companheirismo durante as coletas em Fernando de Noronha;

A Maurizelia de Brito (ICMBIO - Atol da Rocas), Leonardo Silveira (UFPE), Projeto TAMAR (Fernando de Noronha) e Noronha Divers por toda ajuda na obtenção das amostras das ilhas oceânicas;

A Joeliton Bezerra (IBAMA-DF) e Livio Gurjão (IBAMA-CE) pelo auxílio na obtenção das licenças;

Ao Professor Philip A. Hastings, curador da *Marine Vertebrate Collection - Scripps Institution of Oceanography* por gentilmente disponibilizar as amostras do Pacífico;

Ao senhor Iderlindo do Santos (Ponto Focal de CITES/Ponto Focal de Biossegurança / Direção Geral do Ambiente) e Dra. Vanda Monteiro (Instituto Nacional de Desenvolvimento das Pescas - INDP) por toda ajuda para a obtenção da autorização de coleta na República de Cabo Verde;

À professora Caroline Feitosa (LABOMAR-UFC) pelas coletas em Itamaracá e à professora Elisabeth Araújo (UFPE) por disponibilizar o seu laboratório, com a ajuda de Camila Gusmão, para processar o material de Pernambuco;

Ao professor Sergio Floeter e toda equipe do SISBIOTA-MAR, em especial Hudson Pinheiro, Erik Mazzei e Rafael Macieira pela coleta do material do Espírito Santo;

Aos amigos, João Gois, Pedro Luiz (Pedrão) e Ivonilson Gois (Digalan) pelo companheirismo em todos esses anos de amizade, nesse trabalho, em especial, foram fundamentais nos ajudando nas coletas em Cabo Verde, aproveito para agradecer também a escola de mergulho Cabo Verde Diving pelo suporte;

Aos amigos (a) Harbans Arora, Roberto, Petronio, Fred, Evandro, Wanderley e Juliemary pelos ensinamentos;

Aos amigos (as) do Laboratório de Ecologia Animal (LECA) que ainda não foram mencionados, mas que foram fundamentais durante todo o processo (mestrado e doutorado): Amarílis Paiva, Frederico Osório, Gledson Fabiano, Tereza Costa, Wander Godinho, Caio Lívio, Felipe Sousa, Roquelina Saboya, Isabela Ponte, Dayara Normando, Ingrid Siqueira, Tatiana Duarte, Carlos Cavalcante, Sandra Vieira, Tarciana Fortaleza, Nadia Bonnet, Douglas Marques (espero não ter esquecido ninguém) o meu muito obrigado, aprendi muito com cada um de vocês;

Aos vizinhos (as) dos laboratórios Equal e Ecotox pelo companheirismo e excelente convivência regados a ótimos cafês;

Aos colegas estudantes do cursos de graduação e pós-graduação do Labomar (em especial ao amigo Gledson Gastão pela ajuda na confecção dos mapas);

Aos professores (as), servidores (as) e terceirizados (as) do Instituto de Ciências do Mar, por me acolherem durante esse período;

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições;

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) forneceu bolsa de estudo para realização desta pesquisa.

“It is for such inquiries that the modern naturalist collects his materials; it is for this that he still wants to add to the apparently boundless treasures of our national museums, and will never rest satisfied as long as the native country, the geographical distribution, and the amount of variation of any living thing remains imperfectly known”

(Alfred Russel Wallace)

## RESUMO

A família Mullidae está distribuída por todos os mares e oceanos, ocorrendo em zonas tropicais, subtropicais e temperadas. Os peixes dessa família são facilmente reconhecidos pela presença de um par de barbilhões hióides situados na extremidade anterior da maxila inferior. Atualmente são reconhecidas 85 espécies, distribuídas em seis gêneros. O presente estudo teve como objetivo geral estudar os processos evolutivos que resultaram na diversidade e distribuição atual de peixes da família Mullidae. Uma hipótese filogenética já proposta, baseada em dados morfológicos, foi testada por meio de uma filogenia molecular, utilizando dois marcadores mitocondriais: citocromo oxidase I (COI) e RNA ribossomal 16S (16S). Considerando as espécies analisadas, a monofilia de cinco dos seis gêneros foi recuperada. A monofilia do gênero *Parupeneus* não foi recuperada como também a maior parte das relações filogenéticas entre os gêneros não foram esclarecidas. O gênero *Pseudupeneus* é composto por três espécies, sendo duas restritas ao Atlântico - *Pseudupeneus maculatus* (Atlântico Ocidental) e *Pseudupeneus prayensis* (Atlântico oriental e Mediterrâneo) - e uma terceira espécie (*Pseudupeneus grandisquamis*) restrita ao Pacífico oriental. Considerando que limites de distribuição entre as três espécies coincidem com a presença de reconhecidas barreiras biogeográficas (Istmo do Panamá e Barreira Mesoatlântica), foram utilizados três marcadores mitocondriais (COI, 16S e Citocromo b - Cit b) e um nuclear (primeiro íntron da proteína ribossomal nuclear - IS7) para verificar se existe relação entre os processos de especiação dentro do gênero e a formação de barreiras biogeográficas. A maioria das árvores provenientes dos marcadores IS7, 16S e Cit b resultou na formação de um clado constituído pelas espécies irmãs *P. maculatus* e *P. prayensis*, tendo *P. grandisquamis* como clado irmão desse primeiro, indicando esta hipótese como a mais provável. Assim, a especiação dentro desse gênero parece ter sido influenciada pela presença de barreiras biogeográficas, envolvendo processos de vicariância e dispersão. O presente estudo também realizou uma análise filogeográfica de *Pseudupeneus maculatus* ao longo da província zoogeográfica Brasileira. Essa espécie apresenta ampla distribuição no Atlântico Ocidental (de Nova Jersey - Estados Unidos - até Santa Catarina - Brasil). Com base nas subdivisões da Província Brasileira propostas em estudos anteriores com assembleias de peixes recifais, foram analisados indivíduos da espécie *P. maculatus*, oriundos de cinco localidades ao longo da costa brasileira para investigar se a subdivisão seria mantida em nível populacional. Nessa análise, foram utilizados dois marcadores mitocondriais: Cit b e Região controle (RC). Os resultados obtidos sugerem fluxo gênico irrestrito entre as localidades, evidenciando que características ecológicas de *P. maculatus* provavelmente resultam na falta de estruturação genética observada ao longo da Província Brasileira. A filogenia molecular de Mullidae aqui proposta representa, até o momento, o estudo molecular de maior abrangência taxonômica dentro do grupo. Os dados da filogeografia de *P. maculatus* podem contribuir para uma melhor compreensão dos processos evolutivos que atuam em populações de peixes recifais no Atlântico tropical.

**Palavras-chave:** Peixes recifais, evolução, conectividade, Província Brasileira.

## ABSTRACT

The family Mullidae is widely distributed throughout all seas and oceans, living in tropical, subtropical and temperate zones. Fish from this family are easily recognised by the presence of a pair of hyoid barbels located at the anterior end of the jaw. There are currently 85 valid species, distributed in six genera. This study aimed at studying the evolutionary processes that resulted in the present diversity and distribution of fish from the family Mullidae. A previous phylogenetic hypothesis, based on morphological data, was tested by means of a molecular phylogeny, using two mitochondrial markers: cytochrome oxidase I (COI) and ribosomal RNA 16S (16S). Considering the analysed species, monophyly of five out of six genera was recovered. Monophyly of the genus *Parupeneus* was not observed, and phylogenetic relationships among the genera were not clarified. The genus *Pseudupeneus* is composed by three species, two of them restricted to the Atlantic – *Pseudupeneus maculatus* (Western Atlantic) and *Pseudupeneus prayensis* (Eastern Atlantic) – and a third species (*Pseudupeneus grandisquamis*) present only in the Eastern Pacific. Considering that the distribution boundaries of the three species coincide with the presence of well known biogeographic barriers (Panama Isthmus and Mesoatlantic barrier), three mitochondrial markers (COI, 16S and Cytochrome b – Cyt b) and one nuclear marker (first intron of the nuclear ribosomal protein IS7) were used to assess the effect of the biogeographic barriers on the current distribution of the genus. Most trees from the IS7, 16S and Cyt b showed a clade with the sister species *P. maculatus* and *P. prayensis*, having *P. grandisquamis* as a sister taxon of this first clade. Therefore, speciation within this genus seems to be influenced by the presence of biogeographic barriers, through vicariance and dispersion processes. Philogeography of the specie *Pseudupeneus maculatus* was also assessed in the Brazilian zoogeographic province. This species is widely distributed along the Western Atlantic (from New Jersey – USA to Santa Catarina – Brazil). Based on previously proposed subdivisions of the Brazilian Province for reef fish, individuals of *P. maculatus* from five sites along the Brazilian coast were analysed to investigate gene flow and haplotype distribution. For this analysis two mitochondrial markers were used: Cyt b and Control region (RC). Results indicate unrestricted gene flow among sites, pointing that ecological features of *P. maculatus* probably exert strong influence on the lack of genetic structure along the Brazilian Province. The herein proposed molecular phylogeny of Mullidae is, so far, the most inclusive molecular study for the taxon. The phylogeography of *P. maculatus* may contribute to a better understanding of the evolutionary processes acting upon reef fish populations in the tropical Atlantic.

**Keywords:** reef fish, evolution, connectivity, Brazilian Province.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Três espécies do gênero *Pseudupeneus*: (A) *Pseudupeneus maculatus* (Foto: Tito Lotufo), (B) *Pseudupeneus prayensis* (Foto: Ivonilson Gois) e (C) *Pseudupeneus grandisquamis* (Foto: John T. Snow) ..... 18
- Figura 2 - Áreas de ocorrência das três espécies do gênero *Pseudupeneus*, destacando a presença das barreiras biogeográficas: Istmo do Panamá (IP), Barreira Amazônica (BA) e (BMA) Barreira Mesoatlântica..... 19
- Figura 3 - Locais de coleta da espécie *Pseudupeneus maculatus* ao longo província zoogeográfica brasileira, abrangendo pontos de coleta no Nordeste, Sudeste e em ilhas oceânicas. .... 23
- Figura 4 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador COI, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises. ... 37
- Figura 5 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador 16S, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises. ... 38
- Figura 6 - Árvore filogenética da família Mullidae para os marcadores COI e 16S concatenados, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises. .... 39
- Figura 7 - Topologias conflitantes entre os diferentes marcadores e métodos de análise, sejam eles analisados isoladamente ou concatenados. .... 40

- Figura 8 - Árvore filogenética do gênero *Pseudupeneus* para os marcadores COI, 16S, Cit b e IS7 concatenados, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores para IB e *bootstrap* para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). \* representa um valor suporte baixo, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises. .... 41
- Figura 9 - Rede de haplótipos (método *median-joining*) com posterior tratamento por máxima parcimônia da região controle (RC) para a espécie *Pseudupeneus maculatus*. Os comprimentos dos ramos são proporcionais ao número de mutações. Nos casos onde ocorreu mais de uma mutação, a quantidade é representada por linhas transversais. O tamanho dos círculos são proporcionais as frequências de cada haplótipo e as partições (em cores) dentro dos círculos representam a proporção dos haplótipos proveniente de cada localidade. Pequenos círculos brancos representam os vetores médios (haplótipos extintos ou não amostrados) e número romanos destacam os quatro haplogrupos. .... 46
- Figura 10 - Rede de haplótipos (método *median-joining*) com posterior tratamento por máxima parcimônia para o gene Cit b para a espécie *Pseudupeneus maculatus*. *P. Prayensis* (CVPP) e *P. grandisquamis* (CAPG) representam grupos externos. Comprimentos dos ramos são proporcionais ao número de mutações. Nos casos onde ocorreu mais de uma mutação, a quantidade é representada por linhas transversais ou é escrita entre parêntesis. O tamanho dos círculos são proporcionais as frequências de cada haplótipo e as partições (em cores) dentro dos círculos representam a proporção dos haplótipos proveniente de cada localidade. Pequenos círculos brancos representam os vetores médios (haplótipos extintos ou não amostrados) e os número romanos destacam os três haplótipos mais frequentes. .... 48
- Figura 11 - Árvore filogenética baseada em caracteres morfológicos adaptada de Kim (2002), destacando o número de apomorfias que suportam alguns clados, e os valores de obtidos, no presente estudo, para suportar os referidos clados, nos três métodos de análise filogenética (IB/ML/MP), para os dois marcadores (COI e 16S). \* indica que a espécie foi incluída na análise utilizando COI e ° espécie incluída na análise utilizando 16S. - .... 51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies amostradas, incluindo o número de indivíduos coletados por local de amostragem.....	23
Tabela 2 - Regiões do DNA, iniciadores e protocolos de PCR utilizados. ....	26
Tabela 3 - Lista das espécies/sequências utilizada na construção do novo par de iniciadores para gene mitocondrial Cit b para a espécie <i>Pseudupeneus prayensis</i> . ....	27
Tabela 4 - Espécies analisadas na filogenia da família Mullidae para os marcadores COI e 16S. ....	31
Tabela 5 - Modelos de evolução utilizados para cada marcador isoladamente ou concatenados nos seguintes conjuntos de dados: Família abrangente COI (35 espécies de mullídeos + grupo externo), Família abrangente 16S (15 espécies de mullídeos + grupo externo), Família concatenada (13 espécies de mullídeos com sequências disponíveis para COI e 16S + grupo externo), Gênero <i>Pseudupeneus</i> (todos os representantes do gênero <i>Pseudupeneus</i> e dois representantes do gênero <i>Mulloidichthys</i> como grupo externo, analisados isoladamente e concatenados).....	32
Tabela 6 - Pares de clados irmãos utilizados para avaliar a influência de barreiras biogeográficas sobre as espécies do gênero <i>Pseudupeneus</i> . Destacando o marcador utilizado (IS7), o número de acesso no banco de dados (GenBank) e as bibliografias de referência. ....	33
Tabela 7 - Marcadores, Citocromo b (Cit b) e Região controle (RC), número de sequências, número de pares de base (pb) e locais de coleta utilizados para os estudos filogeográficos da espécie <i>Pseudupeneus maculatus</i> . ....	34
Tabela 8 - Distâncias genéticas calculadas para o marcador IS7, utilizando o modelo (K2P - Kimura dois-parâmetros), entre cinco pares de clados irmãos separados pelo Istmo do Panamá e um par separado pela Barreira Mesoatlântica. ....	42
Tabela 9 - Tamanho da amostra (n), Número de haplótipos e índices: diversidade de haplotípica ( $h \pm$ erro padrão) e diversidade de nucleotídica ( $\pi \pm$ erro padrão) para as quatro localidades analisadas. ....	43
Tabela 10 - Valores de $\Phi_{ST}$ para pares de populações de <i>Pseudupeneus maculatus</i> .....	44

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
1.1	Considerações gerais .....	13
1.2	Família Mullidae.....	16
1.3	Gênero <i>Pseudupeneus</i> .....	17
1.4	<i>Pseudupeneus maculatus</i> .....	19
2	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivo geral .....	21
2.2	Objetivos específicos .....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1	Coleta do material biológico.....	22
3.2	Procedimentos de laboratório .....	24
3.3	Análise das sequências .....	28
3.3.1	Análises filogenéticas .....	28
3.3.2	Análises filogeográficas e populacionais.....	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Filogenia da Família Mullidae.....	35
4.1.1	Família Mullidae - marcador COI.....	36
4.1.2	Família Mullidae - marcador 16S .....	37
4.1.3	Família Mullidae - concatenando COI e 16S.....	38
4.2	Filogenia do Gênero <i>Pseudupeneus</i> .....	39
4.3	Espécies irmãs dentro do gênero <i>Pseudupeneus</i> e o soergimento do Istmo do Panamá.....	41
4.4	Filogeografia do gênero <i>Pseudupeneus</i> .....	42
4.4.1	Diversidade genética e estrutura populacional.....	42
5	DISCUSSÃO.....	49
5.1	Família Mullidae.....	49
5.2	Gênero <i>Pseudupeneus</i> .....	53
5.3	Filogeografia de <i>Pseudupeneus maculatus</i> .....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8	APÊNDICES.....	76
8.1	Apêndice - A.....	76
8.2	Apêndice - B.....	77
8.3	Apêndice - C.....	79

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

O conjunto de animais popularmente denominados peixes, mesmo não constituindo um grupo natural, representa mais da metade de todas as espécies de vertebrados vivos (HELFMAN *et al.*, 2009). Isso equivale a cerca de 31.000 espécies válidas, com aproximadamente 200 a 300 novas espécies sendo descritas anualmente (ESCHMEYER *et al.*, 2010). Segundo Bellwood (1998), algumas espécies de peixes apresentam íntima associação com os ambientes recifais sendo estas denominadas por vasta literatura como “peixes recifais”. A antiga relação ecológica existente entre essas espécies e os ecossistemas recifais não foi iniciada em um único evento. Acredita-se que diferentes linhagens colonizaram os recifes em diferentes épocas, com pelo menos dois períodos de intensa colonização, um no Cretáceo Superior (90-72 Ma) e outro imediatamente após a grande extinção do Cretáceo-Paleogeno (65-56 Ma) (PRICE; SCHMITZ, 2014).

A maioria das espécies de peixes recifais, em um momento inicial do ciclo de vida, apresenta uma fase larval planctônica com características morfológicas e ecológicas distintas das encontradas nos indivíduos adultos (LEIS, 1991; HALL; WAKE, 1999). Muitos desses animais, por apresentarem pouca capacidade de efetuar longas migrações quando adultos, se utilizam de sua fase planctônica para alcançar áreas distantes ainda não ocupadas (SALE, 1991). Por esse motivo, muitos fatores podem influenciar a distribuição desses animais, por exemplo, a direção das correntes marinhas, o tipo de desova (pelágica ou demersal), o tempo de duração larval e a existência de barreiras biogeográficas (DOHERTY *et al.*, 1995).

Barreiras biogeográficas são obstáculos que restringem o fluxo de indivíduos/genes de uma população ou localidade para outra (BROWN; LOMOLINO, 2006). No ambiente marinho, tais barreiras podem ser efetivas, impedindo totalmente o fluxo gênico, ou porosas, impedindo de forma seletiva a conectividade entre espécies e/ou populações (LUIZ *et al.*, 2012; BOWEN *et al.*, 2013). Em uma pesquisa abrangente, Floeter *et al.* (2008) destacaram a existência de cinco barreiras biogeográficas principais para o Oceano Atlântico tropical, sendo a primeira barreira a distância superior a 3500 km que separa a América do Sul do continente Africano (84 Ma). A segunda foi originada pelo fechamento do Mar de Tethys, separando a fauna recifal dos oceanos Atlântico e Índico (12 - 18 Ma). A terceira é provocada pelo deságue dos rios Amazonas e Orinoco, separando os ambientes recifais caribenhos dos brasileiros (11 Ma). A quarta barreira teve início devido ao fechamento do Istmo do Panamá, separando ambientes recifais dos oceanos Atlântico e Pacífico (3,1 Ma). Finalmente, a quinta barreira é ocasionada pelas águas frias da corrente de Benguela, separando a fauna recifal dos oceanos Atlântico e Índico no extremo sul do continente Africano (2 Ma). Outro caso que merece destaque, mesmo sendo menos intenso do que as barreiras citadas anteriormente, é o das ilhas oceânicas brasileiras que, devido ao isolamento (FLOETER; GASPARINI, 2000) e a condições ecológicas distintas das do continente (ROCHA, 2003), apresentam consideráveis taxas de endemismo.

Eventos de cladogênese podem estar intimamente associados à ocorrência de barreiras biogeográficas. No processo de especiação alopátrica, populações de uma determinada espécie são separadas geograficamente por uma barreira, promovendo a interrupção do fluxo gênico entre elas. As subunidades da população original, então, ao sofrerem pressões evolutivas distintas, acumulam diferenças tão significativas que,

mesmo ocorrendo um reencontro, elas permanecerão reprodutivamente isoladas (PALUMBI, 1994; MAYR, 2009). A gênese de uma especiação alopátrica pode ser explicada por dois possíveis mecanismos: um evento vicariante ou um evento de dispersão entre regiões previamente separadas. Estimativas do tempo formação da barreira e do tempo de divergência entre linhagem separadas por esta barreira, são bons indicativos na tentativa de descobrir, entre esses os dois possíveis mecanismos, qual a explicação mais plausível (BROWN; LOMOLINO, 2006).

Também são reconhecidos modelos onde o processo de especiação se dá na presença de um potencial fluxo gênico. Um exemplo é o processo de especiação ecológica parapátrica, que ocorre quando populações que ocupam áreas adjacentes, mas potencialmente conectadas por fluxo gênico, divergem em função de condições ecológicas distintas (HARRISON, 2012). Este modelo foi sugerido como uma das explicações que podem ajudar a decifrar o enigma da alta diversidade observada nas assembleias de peixes recifais atuais (ROCHA; ROBERTSON; ROMAN; *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, somando-se aos estudos morfológicos tradicionais, vem se destacando a utilização de marcadores moleculares em investigações de processos evolutivos (AVISE, 2004). Nesses estudos, os dados moleculares vem sendo interpretados seguindo três abordagens principais: a genética de populações, a sistemática filogenética e a filogeografia, sendo essa última uma forma de integração entre as duas primeiras (AVISE, 2009; HICKERSON *et al.*, 2010). Sequências de DNA, de regiões codificadoras de proteínas ou não, são frequentemente utilizadas em estudos evolutivos. Todavia, deve-se sempre buscar uma sintonia entre a taxa de evolução da região do DNA utilizada (marcador) e o tipo de questão a ser respondida, seja ela filogenética, filogeográfica ou populacional (RUSSO *et al.*, 2012).

## 1.2 Família Mullidae

Os peixes da família Mullidae estão distribuídos por todos os mares e oceanos, e muitos deles são consumidos pelo homem. No Brasil são conhecidos como trilhas, salmonetes ou saramunetes, e em inglês são chamados genericamente de “goat fishes” (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; CERVIGÓN, 1993). No nordeste brasileiro existem pescarias direcionadas para algumas espécies de mulídeos, atividade esta que vem aumentando o esforço de captura nos últimos anos (SANTANA *et al.*, 2006). Em consequência desse aumento no esforço de pesca, os peixes da família Mullidae atualmente ocupam terceiro lugar, em biomassa, dentre os peixes recifais mais exportados pelo estado do Rio Grande do Norte (CUNHA *et al.*, 2012). Algumas características dos peixes dessa família, por exemplo, ocorrência em diferentes ambientes costeiros como recifes de coral e fundo arenosos, íntima associação com o substrato, sensibilidade a variações na temperatura e sua importância para o setor pesqueiro, os qualificam como indicadores ambientais (espécies-chave) para o monitoramento e gestão de ecossistemas costeiros. Sendo possível analisar variáveis como: impacto da atividade pesqueira, modificações no ambiente induzidas pelo homem e alterações climáticas globais (UIBLEIN, 2007).

Para a família Mullidae atualmente são reconhecidas 85 espécies, sendo 18 destas descritas nos últimos dez anos (ESCHMEYER, 2014). As espécies estão distribuídas em seis gêneros: *Upeneus* Cuvier, 1829, *Mulloidichthys* Whitley, 1929, *Mullus* Linnaeus, 1758, *Upeneichthys* Bleeker, 1855, *Parupeneus* Bleeker, 1863 e *Pseudupeneus* Bleeker, 1862 (NELSON, 2006). De acordo com a análise filogenética mais recente, baseada em caracteres morfológicos, Mullidae apresenta-se como um grupo monofilético que tem suporte de 26 apomorfias. Treze caracteres são autapomorfias da família, com destaque

para a transformação dos primeiros raios branquiostegais em barbilhões hióides (situados na extremidade anterior da maxila inferior) (KIM, 2002). Os barbilhões hióides apresentam função sensorial e tátil, sendo utilizados em atividades essenciais como a identificação e captura de alimento (GOSLINE, 1984; MCCORMICK, 1993).

Kim (2002) encontrou seis subclados, apoiados por caracteres morfológicos, dentro de Mullidae que correspondem aos seis gêneros atualmente reconhecidos. Apesar de existirem pesquisas onde foram propostas hipóteses filogenéticas, baseadas em dados moleculares, incluindo representantes de alguns gêneros de mulídeos (e.g. GOLANI; RITTE, 1999; APOSTOLIDIS *et al.*, 2001; KESKIN; CAN, 2009; LESSIOS; ROBERTSON, 2013; BOS, 2014; SONG *et al.*, 2014), não foram encontradas filogenias moleculares incluindo representantes de todos gêneros reconhecidos.

### 1.3 Gênero *Pseudupeneus*

Atualmente são reconhecidas três espécies para gênero *Pseudupeneus* (FIGURA 1). Duas destas têm distribuição geográfica restrita ao oceano Atlântico: *Pseudupeneus maculatus* (Bloch, 1793) (Atlântico Ocidental) e *Pseudupeneus prayensis* (Cuvier 1829) (Atlântico oriental e Mediterrâneo). A terceira espécie, *Pseudupeneus grandisquamis* (Gill 1863), ocorre somente no Pacífico oriental (ESCHMEYER, 2014). Com base em caracteres morfológicos de duas espécies (*P. Prayensis* e *P. Grandisquamis*), o gênero *Pseudupeneus* foi considerado monofilético (KIM, 2002). Entretanto, as relações filogenéticas entre as três espécies nunca foram estudadas.

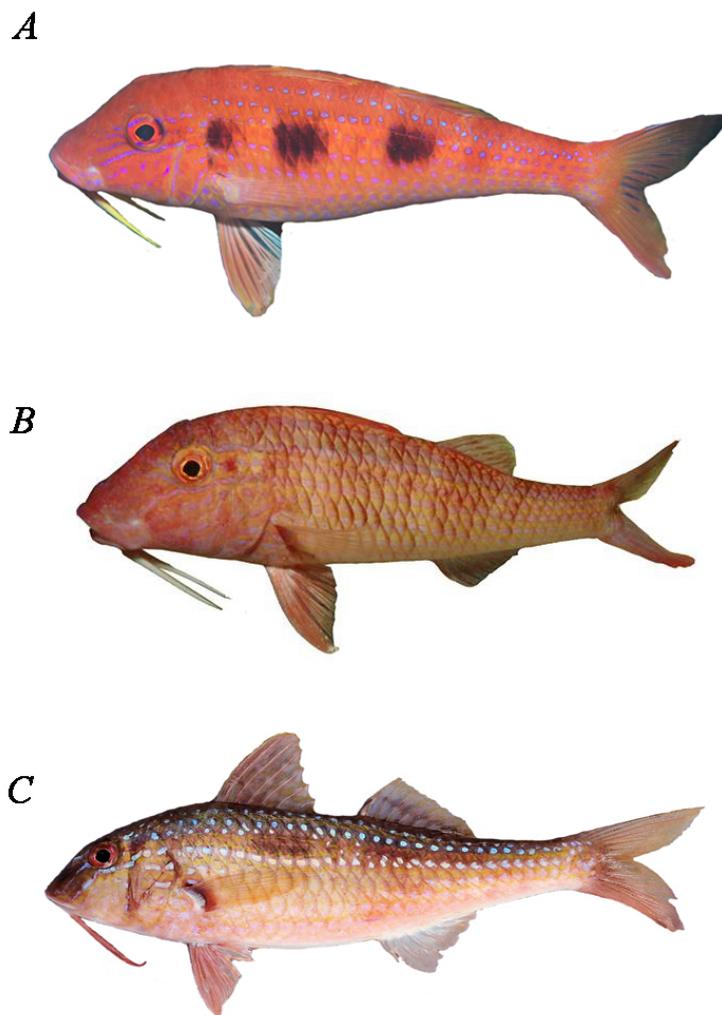


Figura 1 - Três espécies do gênero *Pseudupeneus*: (A) *Pseudupeneus maculatus* (Foto: Tito Lotufo), (B) *Pseudupeneus prayensis* (Foto: Ivonilson Gois) e (C) *Pseudupeneus grandisquamis* (Foto: John T. Snow)

Um fato que merece destaque é que os limites de distribuição entre as três espécies de *Pseudupeneus* coincidem com a presença de reconhecidas barreiras biogeográficas (Istmo do Panamá e Barreira Mesoatlântica) (ver FLOETER *et al.*, 2008; LESSIOS, 2008) (FIGURA 2). Este fato leva à seguinte indagação: existe alguma relação evolutiva entre a atual distribuição desse gênero e a presença de barreiras biogeográficas?

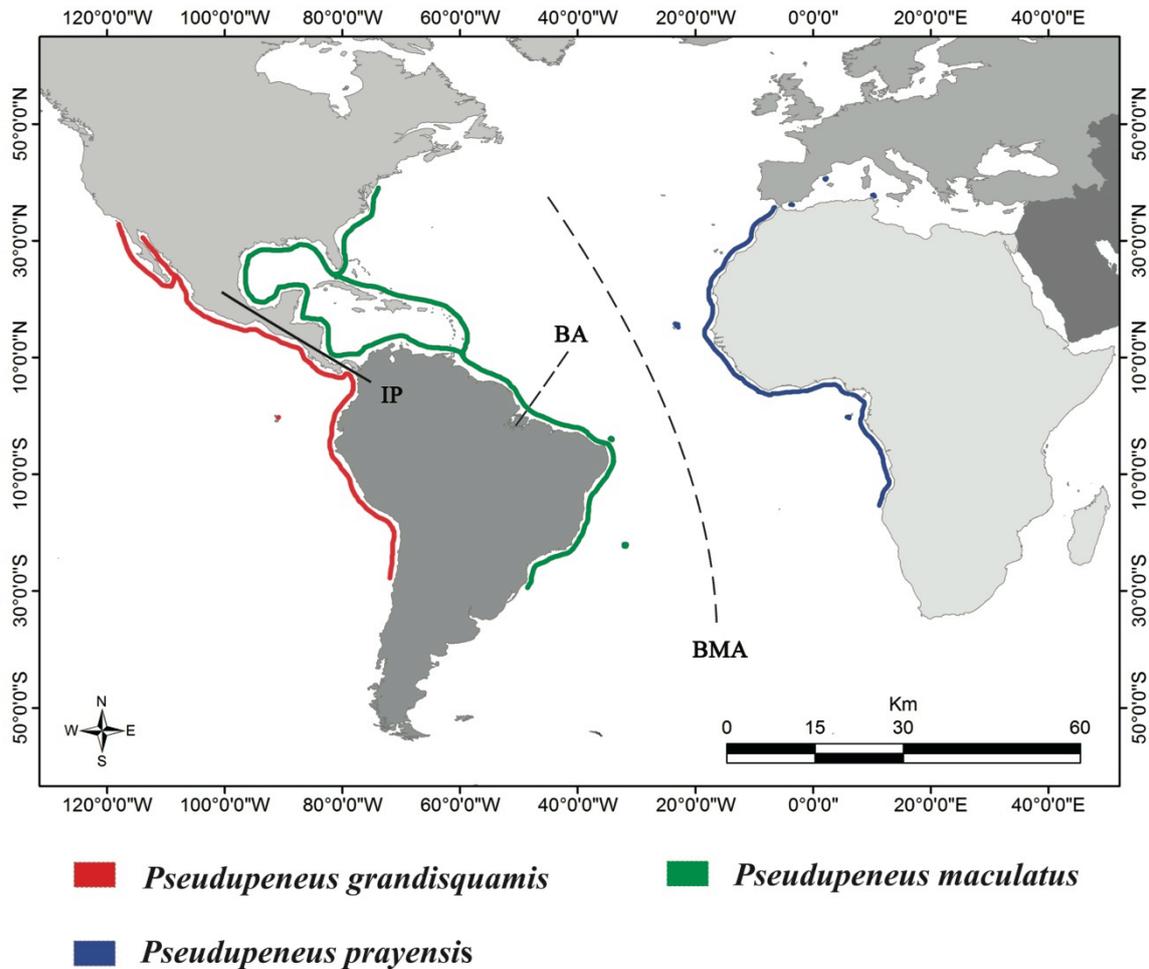


Figura 2 - Áreas de ocorrência das três espécies do gênero *Pseudupeneus*, destacando a presença das barreiras biogeográficas: Istmo do Panamá (IP), Barreira Amazônica (BA) e (BMA) Barreira Mesoatlântica.

#### 1.4 *Pseudupeneus maculatus*

A espécie *Pseudupeneus maculatus* (FIGURA 1 A) é considerada típica de ambientes recifais e fundos arenosos adjacentes aos recifes, sendo normalmente encontrada em águas rasas, apesar da existência de registros de captura em profundidade até 90 metros (CERVIGÓN, 1993). Sua distribuição vai de Nova Jersey (Estados Unidos) até Santa Catarina (Brasil), incluindo o Golfo do México e todo o Mar do Caribe (FROESE; PAULY, 2014). Dentro da área de distribuição desta espécie, além de recifes continentais, estão incluídas ilhas oceânicas, tanto no oceano Atlântico Norte quanto no

Atlântico Sul. Também dentro dessa área, merece destaque a presença de uma reconhecida barreira biogeográfica (Barreira Amazônica, FIGURA 2) que é apontada como sendo um dos fatores mais importantes para explicar as divergências observadas entre as províncias zoogeográficas brasileiras e caribenha (BRIGGS, 1974; ROCHA, 2003).

Os ambientes recifais da província zoogeográfica brasileira estão distribuídos desde o Parcel do Manuel Luiz, no Maranhão, até os fundos rochosos de Santa Catarina, incluindo ainda cinco áreas insulares – Atol das Rocas, Arquipélago Fernando de Noronha, Arquipélago de São Pedro e São Paulo e Arquipélago de Trindade e Martim Vaz – (FLOETER; GASPARINI, 2000). A ictiofauna presente nesses ambientes tem sido alvo de um considerável número de pesquisas abordando áreas diversas, como taxonomia (*e.g.* SAZIMA *et al.*, 1998; ROCHA; ROSA, 1999; MOURA *et al.*, 2001), etologia (*e.g.* FRANCINI-FILHO *et al.*, 2000; SAZIMA *et al.*, 2000), ecologia (*e.g.* ROCHA; ROSA, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004; HONÓRIO *et al.*, 2010), biogeografia (FLOETER; GASPARINI, 2000; FLOETER *et al.*, 2001, 2008), filogenia (*e.g.* ROCHA; LINDEMAN; *et al.*, 2008; ALVA-CAMPBELL *et al.*, 2010) e filogeografia (*e.g.* BOWEN *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2002; ROCHA; ROBERTSON; ROCHA; *et al.*, 2005; ROCHA; ROCHA; *et al.*, 2008). Pesquisas baseadas na abundância e/ou na composição taxonômica das assembleias de peixes recifais identificaram, pelo menos, três subdivisões dentro da província brasileira: (1) ambientes recifais do Sul e Sudeste (2) ambientes recifais do Nordeste e (3) ambientes recifais de ilhas oceânicas (FLOETER *et al.*, 2001, 2008; FERREIRA *et al.*, 2004; FEITOZA *et al.*, 2005). Com base nessa subdivisão da província brasileira proposta para assembleias de peixes recifais, surge a seguinte pergunta: estaria esse mesmo padrão mantido em nível populacional?

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Descrever processos evolutivos que resultaram na diversidade e distribuição atual de peixes da família Mullidae.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Testar a hipótese filogenética baseada em dados morfológicos da família Mullidae, por meio de uma filogenia molecular a partir de espécies representantes de cada gênero que compõe essa família.

- Produzir uma hipótese sobre a filogenia do gênero *Pseudupeneus*, interpretando-a quanto à possível influência de barreiras biogeográficas.

- Estudar a filogeografia de *Pseudupeneus maculatus* ao longo da província zoogeográfica Brasileira.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material biológico

Todos os espécimes foram coletados durante a execução do projeto entre 2010 e 2013, com exceção das espécies do Pacífico, *Pseudupeneus grandisquamis* (Gill 1863) e *Mulloidichthys dentatus* (Gill 1862), das quais foram obtidas somente amostras de tecido, cedidas pela *Marine Vertebrate Collection - Scripps Institution of Oceanography* (TABELA 1). Foi realizada uma expedição para a Ilha do Sal, República de Cabo Verde, para coleta de indivíduos da espécie *Pseudupeneus prayensis*. Tendo como finalidade os estudos populacionais, foram realizadas cinco expedições, objetivando obter amostras da espécie *Pseudupeneus maculatus* em cinco localidades ao longo da província zoogeográfica brasileira (TABELA 1). A escolha dos locais de coleta visou incluir amostras do Nordeste, do Sudeste e de ilhas oceânicas brasileiras (FIGURA 3).

Os animais foram capturados por meio de mergulho livre e/ou autônomo utilizando redes ou arpões. Alguns exemplares foram comprados diretamente de pescadores ou em mercados locais. Todas as coletas e o transporte (nacional e internacional) do material biológico foram devidamente autorizados tanto no Brasil (IBAMA - SISBIO 25153-3, CITES 12BR007699/DF) quanto na República de Cabo Verde (Direção Geral do Ambiente - 042012). Os espécimes foram identificados seguindo chaves propostas para as espécies do Atlântico Ocidental (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; CERVIGÓN, 1993) como também pelos guias de identificação das espécie do Atlântico Oriental (BEN-TUVIA, 1981; SCHNEIDER, 1990).

Para cada espécime foram retiradas amostras de tecido muscular, sendo estas acondicionadas em microtubos (1,5 ml), conservadas em álcool etílico 96% e

armazenadas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todos os espécimes coletados (*vouchers*) foram transportados para o laboratório, fixados em solução de formol 4% e depositados na coleção Ictiológica Dias da Rocha (CIDRO) da Universidade Federal do Ceará. Com exceção dos espécimes do Pacífico (mencionados anteriormente) e os do Espírito Santo, dos quais só foi possível obter as amostras de tecido.

Tabela 1 - Espécies amostradas, incluindo o número de indivíduos coletados por local de amostragem.

Espécie	Total de indivíduos	Locais (quantidade por local)
<i>Mulloidichthys dentatus</i> (Gill 1862)	1	Califórnia - EUA*
<i>Mulloidichthys martinicus</i> (Cuvier 1829)	3	Atol da Rocas - Brasil (1) Pernambuco - Brasil (2)
<i>Mullus argentinae</i> Hubbs & Marini 1933	3	São Paulo - Brasil (3)
<i>Pseudupeneus grandisquamis</i> (Gill 1863)	1	Califórnia - EUA*
<i>Pseudupeneus maculatus</i> (Bloch 1793)	115	Atol das Rocas - Brasil (4) Ceará - Brasil (30) Espírito Santo - Brasil (21) Fernando de Noronha - Brasil (30) Pernambuco - Brasil (30)
<i>Pseudupeneus prayensis</i> (Cuvier 1829)	3	Ilha do Sal - Cabo Verde (30)
<i>Upeneus parvus</i> Poey 1852	1	Ceará - Brasil (1)

\* Amostras de tecido cedidas pela *Marine Vertebrate Collection - Scripps Institution of Oceanography*.



Figura 3 - Locais de amostragem de *Pseudupeneus maculatus* ao longo da província zoogeográfica brasileira, abrangendo pontos de coleta no Nordeste, Sudeste e em ilhas oceânicas.

### 3.2 Procedimentos de laboratório

A presente pesquisa é dividida em duas abordagens: (1) análises filogenéticas da família Mullidae e do gênero *Pseudupeneus* e (2) análises filogeográficas e populacionais da espécie *Pseudupeneus maculatus*. Para as análises filogenéticas, foram utilizadas sequências parciais de três marcadores moleculares mitocondriais: Citocromo c oxidase subunidade I (COI), Citocromo b (Cit b) e RNA ribossomal 16S (16S). Além dos marcadores mitocondriais, também foram utilizadas sequências parciais do primeiro íntron da proteína ribossomal nuclear IS7 (IS7). A escolha desses marcadores deveu-se aos mesmos terem obtido sucesso em resolver questões filogenéticas entre vários grupos de peixes recifais e apresentarem protocolos e iniciadores (*primers*) bem definidos (ver revisão em LESSIOS, 2008). Além disso, os marcadores moleculares escolhidos possibilitam a obtenção de sinais filogenéticos provenientes de diferentes regiões do DNA (genes codificadores de proteína, gene de RNA e região não codificante nuclear) que podem apresentar diferentes taxas de evolução (RUSSO *et al.*, 2012). A disponibilidade de sequências de DNA de espécies não coletadas no presente estudo em bancos de dados, como o GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) e BOLD ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) também influenciou a escolha dos marcadores.

Sequências parciais de dois marcadores mitocondriais foram utilizadas para as análises populacionais e filogeográficas: a Região Controle do DNA mitocondrial (RC), e o gene mitocondrial Citocromo b (Cit b) que são bastante indicados para investigar esse tipo de questão (AVISE, 2000).

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), sendo seguida a metodologia proposta pelo fabricante. A concentração e a

pureza do DNA extraído foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro de microvolumes (NanoDrop 2000 Thermo Scientific).

As amplificações das regiões genômicas foram realizadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume final de 25µl, contendo: soluções comerciais previamente preparadas para reações de PCR (GoTaq® Green Master Mix - Promega e KAPA2GTM Robust Hotstart ReadyMix (2X) - Kapabiosystems), 100 ng de DNA genômico molde e iniciadores (*primers*) ajustados para concentrações finais entre 0,5 - 1,0 µM. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Bio-Rad C1000) seguindo protocolos específicos (TABELA 2).

Durante o presente estudo, foram encontradas dificuldades para amplificar sequências do gene *Cit b* para a espécie *Pseudupeneus prayensis*. Para contornar o problema foi desenvolvido, durante o presente estudo, um novo par de iniciadores objetivando amplificar sequências homólogas às já obtidas para as outras espécies analisadas.

A construção do par de iniciadores foi baseada em alinhamentos a partir de sequências completas do gene *Cit b* de uma outra espécie da família Mullidae e genomas mitocondriais completos de outros Perciformes pertencentes à família Sciaenidae (TABELA 3). As sequências foram alinhadas e os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Geneious 7.1.5.

Parâmetros que poderiam comprometer a eficiência dos iniciadores, tais como tamanho da sequência, temperatura de fusão, temperatura de hibridização, porcentagens de CG e formação de estruturas secundárias, foram checados utilizando o software OligoAnalyzer 3.1 ([www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer](http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer)).

Tabela 2 - Regiões do DNA, iniciadores e protocolos de PCR utilizados.

Marcador	Iniciadores (direto e reverso) e Protocolos de PCR
<b>COI</b>	(VF2_t1) TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC (IVANOVA <i>et al.</i> , 2007) (FR1d_t1) CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA (IVANOVA <i>et al.</i> , 2007)  PCR - Desnaturação inicial: 95° C por 2 minutos, 35 ciclos (desnaturação: 94° C por 30 segundos, hibridização: 52° C por 30 segundos, extensão: 72° C por 1 minuto), extensão final: 72° C por 10 minutos (ZHANG; HANNER, 2011). +
<b>Cit b</b>	(Forward) GTGACTTGAAAAACCACCGTTG (SONG <i>et al.</i> , 1998) (H15573) AATAGGAAGTATCATTCGGGTTTGATG (MEYER, 1993)  PCR - Desnaturação inicial: 94° C por 2 minutos, 35 ciclos (desnaturação: 94° C por 45 segundos, hibridização: 50° C por 45 segundos, extensão: 72° C por 55 segundos), extensão final: 72° C por 2,5 minutos (ROCHA; LINDEMAN; <i>et al.</i> , 2008). +
<b>Cit b *</b>	(CytB800f) GGCTTGAAAAACCACCGTTGTTA (Presente estudo) (CytB800r) AGGAAGTACCACTCAGGCTTAATATG (Presente estudo)  PCR - Desnaturação inicial: 95° C por 2 minutos, 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 15 segundos, hibridização: 53° C por 15 segundos, extensão: 72° C por 15 segundos), extensão final: 72° C por 2,5 minutos. ×
<b>16S</b>	(L2510) CGCCTGTTTACCAAAAACAT (PALUMBI, 1996) (H3084) AGATAGAAACTGACCTGGAT (PALUMBI, 1996)  PCR - Desnaturação inicial: 95° C por 2 minutos, 35 ciclos (desnaturação: 95° C por 15 segundos, hibridização: 50° C por 15 segundos, extensão: 72° C por 15 segundos), extensão final: 72° C por 3 minutos. ×
<b>IS7</b>	(IS7RPEX1F) TGGCCTCTTCCTTGCCGTC (CHOW; HAZAMA, 1998) (IS7RPEX2R) AACCTCGTCTGGCTTTTCGCC (CHOW; HAZAMA, 1998)  Desnaturação inicial: 95° C por 1 minutos, 30 ciclos (desnaturação: 95° C por 30 segundos, hibridização: 60° C por 1 minuto, extensão: 72° C por 2 minutos), extensão final: 72° C por 10 minutos (CHOW; HAZAMA, 1998). +
<b>RC</b>	(CR-A) TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG (LEE <i>et al.</i> , 1995) (CR-E) CCTGAAGTAGGAACCAGATG (LEE <i>et al.</i> , 1995)  Desnaturação inicial: 94° C por 2 minutos, 35 ciclos (desnaturação: 94° C por 45 segundos, hibridização: 52° C por 1 minuto, extensão: 72° C por 1 minuto), extensão final: 72° C por 10 minutos (BELDADE <i>et al.</i> , 2009). +

\* Par de iniciadores desenvolvidos durante a presente pesquisa para a espécie *Pseudupeneus prayensis*.

× Protocolo utilizado para o Mix KAPA2G Robust Hotstart, Kapabiosystems.

+ Protocolo utilizado para o Mix GoTaq® Green Master Mix, Promega.

A confirmação da amplificação da região de interesse foi realizada por meio de eletroforese em géis de agarose a 1% com tampão Tris-borato (TBE 1X), contendo SYBR® *safe* (Invitrogen) e posteriormente fotografados sob luz ultravioleta por um fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc XR+). A estimativa de concentração do DNA

amplificado, baseada na intensidade das bandas, foi realizada utilizando o software Image Lab™ 2.0.1, calibrado por um marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - New England BioLabs).

Tabela 3 - Lista das espécies/sequências utilizada na construção do novo par de indiciadores para gene mitocondrial Cit b para a espécie *Pseudupeneus prayensis*.

<b>Família/Espécie</b>	<b>Acesso (GenBank) e referência</b>
Mullidae	
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus 1758	DQ197965.1, EF439553.1, EF439554.1 GONZALEZ-SEVILLA, R <i>et al.</i> *
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus 1758	EU036453.1, EU036454.1, EU036455.1, EU036456.1, EU036457.1, KREY, G <i>et al.</i> *
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus 1758	EU224023.1, EU224024.1 VERREZ-BAGNIS, V S <i>et al.</i> *
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus 1758	EU492131.1 PELT-HEERSCHAP, H V; STEIN, A S <i>et al.</i> *
Sciaenidae	
<i>Sciaenops ocellatus</i> (Linnaeus 1766)	NC_016867.1 (CHENG; SHI; <i>et al.</i> , 2012)
<i>Collichthys niveatus</i> Jordan & Starks 1906	HM219223.1 (XU <i>et al.</i> , 2011)
<i>Larimichthys crocea</i> (Richardson 1846)	NC_011710.1 (CUI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Larimichthys polyactis</i> (Bleeker 1877)	GU586227.1 (CHENG; WANG; <i>et al.</i> , 2012)
<i>Johnius grypotus</i> (Richardson 1846)	NC_021130.1 (ZHANG <i>et al.</i> , 2013)
<i>Chrysochir aureus</i> (Richardson 1846)	NC_016987.1 XU, T J <i>et al.</i> *
<i>Argyrosomus japonicus</i> (Temminck & Schlegel 1843)	NC_017610.1 XU, T J <i>et al.</i> *

\* Dados disponíveis no GenBank, mas não publicados

Os produtos das amplificações foram purificados por reação enzimática utilizando ExoSAP-IT® (Affymetrix, Inc.), seguindo as orientações do fabricante. As amostras purificadas foram então enviadas para a empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), onde foram sequenciadas pelo método de Sanger, nos dois sentidos, e lidas em sequenciador automático capilar.

### 3.3 Análise das sequências

#### 3.3.1 Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram editadas no programa Geneious 7.1.5. Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa MAFFT v7.017 com algoritmo G-INS-i (KATOHI; STANDLEY, 2013) implementado no Geneious 7.1.5, seguido de correção manual quando necessário. Também, nesse mesmo programa, foram realizadas as traduções para aminoácidos das sequências de Cit b e COI. Este procedimento objetivou identificar possíveis sequências problemáticas contendo códons de parada. Para cada região do DNA estudada foi selecionado um modelo de evolução, seguindo o critério de informação bayesiano (BIC) (LUO *et al.*, 2010), pelo software JModeltest 2.1.4 (GUINDON; GASCUEL, 2003; DARRIBA *et al.*, 2012). Nos casos em que o modelo escolhido pelo JModeltest incluía simultaneamente a taxa de proporção de sítios invariáveis e a distribuição gama (I + G), foi feita a opção de utilizar somente a distribuição gama, devido a possíveis problemas ocasionados pela forte correlação entre esses dois parâmetros (YANG, 2006; HURTADO *et al.*, 2014).

A saturação dos dados foi avaliada através de elaborados gráficos onde constavam a relação entre o número de transições e transversões versus distâncias genéticas (K80) (XIA; LEMEY, 2009). Além desse método, também foram aplicados testes utilizando o Índice de saturação de substituição (XIA *et al.*, 2003). Os gráficos e as análises foram feitos no programa DAMBE (XIA, 2013).

Foram utilizados diferentes conjuntos de dados para contemplar os diferentes objetivos desta pesquisa. Sempre que possível, três indivíduos de cada espécie foram sequenciados para cada marcador. Contudo, todas as análises filogenéticas foram realizadas utilizando somente uma sequência de cada espécie. Sequências obtidas no

Genbank foram utilizadas com o objetivo de obter a melhor representatividade possível de táxons para cada marcador. Para a filogenia da família Mullidae, primeiramente foram construídas duas matrizes independentes, utilizando sequências dos marcadores COI (35 espécies, 573 pares de base), e 16S (15 espécies, 467 pares de base) sendo incluídos representantes de todos os seis gêneros (TABELA 4). Uma outra matriz foi construída com um número menor de espécies (13) para os marcadores COI (573 pb) e 16S (550 pb). Essa matriz foi utilizada em uma análise combinada entre ambos os marcadores (análise concatenada).

Para a filogenia do gênero *Pseudupeneus* todas as sequências utilizadas foram obtidas no presente estudo. Foram construídas matrizes, incluindo todos os representantes do gênero, para os marcadores COI (666 pb), 16S (594 pb), Cyt b (693 pb) e IS7 (498). Estes foram analisados isoladamente, concatenados somente os mitocondriais e concatenados todos os marcadores (mitocondriais e nuclear). Os modelos de evolução utilizados estão indicados na Tabela 5.

Mesmo tendo sido reconhecida a monofilia da família, um grupo irmão de Mullidae ainda não foi proposto. Algumas famílias são sugeridas como grupos próximos com base tanto em caracteres morfológicos (KIM, 2002) quanto moleculares (BETANCUR-R *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014). No entanto, não existe uma concordância entre essas duas abordagens. Para este trabalho, foram escolhidos dois representantes: um da família Hapalogenyidae (*Hapalogenys nigripinnis*, Temminck & Schlegel 1843) baseado em filogenia morfológica e outro da família Fistulariidae (*Fistularia petimba* Lacepède, 1803) baseado em filogenia molecular. Para o gênero *Pseudupeneus*, foram utilizados como grupos externos, representantes do gênero

*Mulloidichthys*, que são reconhecidos como grupos próximos tanto pela morfologia (KIM, 2002) quanto por filogenias moleculares (LESSIOS; ROBERTSON, 2013).

As árvores filogenéticas foram construídas por três métodos: Máxima Verossimilhança (ML), Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Parcimônia (MP). As análises de ML foram realizadas utilizando o programa PHYML 3.0 (GUINDON *et al.*, 2010), implementado no Geneious 7.1.5. Nas análises concatenadas utilizando ML foram calculados modelos de evolução que representassem os novos conjuntos de dados (TABELA 5). A confiabilidade dos nós foi avaliada pelo método de *bootstrap* com 10.000 repetições. As árvores bayesianas foram construídas com o programa MrBayes 3.2.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) implementado no Geneious 7.1.5. As análises foram calculadas com 5.000.000 de gerações em quatro cadeias e duas corridas, sendo amostrados valores a cada 1.000 gerações. Foram descartados os primeiros 25% das árvores amostradas (*burn-in*). Nas análises bayesianas concatenadas cada marcador foi tratado como uma partição, onde foram atribuídos modelos de evolução e parâmetros específicos para cada partição. Os suportes das árvores bayesianas foram avaliados pelas probabilidades posteriores. As análises de máxima parcimônia foram realizadas no programa MEGA (TAMURA *et al.*, 2013), utilizando os algoritmos de busca heurística TBR (*tree-bisection-and-regrafting*). A robustez, nas análises de MP, foi avaliada por *bootstrap* com 1.000 repetições. Nos casos onde emergiram mais de uma árvore igualmente parcimoniosa para a mesma análise, foi escolhida a árvore com o maior valor de *bootstrap*.

Tabela 4 - Espécies analisadas na filogenia da família Mullidae para os marcadores COI e 16S.

Espécies	Marcador-Acesso (GenBank) e referência			
	COI	Referência	16S	Referência
<b>Grupo externo</b>				
<i>Fistularia petimba</i> Lacepède, 1803	AP012312	(SONG <i>et al.</i> , 2014)	AP012312	(SONG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Hapalogenys nigripinnis</i> Temminck & Schlegel, 1843	HM754620	(LIANG <i>et al.</i> , 2012)	HM754620	(LIANG <i>et al.</i> , 2012)
<b>Familia Mullidae</b>				
<i>Mulloidichthys dentatus</i> (Gill, 1862)		Presente estudo		Presente estudo
<i>Mulloidichthys flavolineatus</i> (Lacepède, 1801)	JQ431921	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Mulloidichthys martinicus</i> (Cuvier, 1829)		Presente estudo		Presente estudo
<i>Mulloidichthys vanicolensis</i> (Valenciennes, 1831)	AP012310	(SONG <i>et al.</i> , 2014)	AP012310	(SONG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mullus argentinae</i> Hubbs & Marini, 1933		Presente estudo		
<i>Mullus auratus</i> Jordan & Gilbert, 1882	KF930150	BENTLEY, A C.; WILEY, E O*		
<i>Mullus barbatus</i> Linnaeus, 1758	KC500972	(KESKIN; ATAR, 2013)	GQ485287	YOKES, M B
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	JQ774876	(COSTA <i>et al.</i> , 2012)	GQ485288	YOKES, M B
<i>Parupeneus barberinoides</i> (Bleeker, 1852)	FJ583835	(STEINKE <i>et al.</i> , 2009)		
<i>Parupeneus barberinus</i> (Lacepède, 1801)	JQ350180	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus chrysonemus</i> (Jordan & Evermann, 1903)	DQ521024	JAMES, S A <i>et al.</i> *		
<i>Parupeneus ciliatus</i> (Lacepède 1802)	JQ431978	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus cyclostomus</i> (Lacepède, 1801)	JQ350184	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus forsskali</i> (Fourmanoir & Guézé, 1976)	FJ347965	(LAKRA <i>et al.</i> , 2011)		
<i>Parupeneus fraserorum</i> Randall & King, 2009	JQ350186	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus heptacanthus</i> (Lacepède, 1802)	HQ149896	(ASGHARIAN <i>et al.</i> , 2011)		
<i>Parupeneus indicus</i> (Shaw, 1803)	FJ237882	ZHANG, J; HANNER, R*		
<i>Parupeneus insularis</i> Randall & Myers, 2002	JQ431985	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus macronemus</i> (Lacepède, 1801)	JQ350191	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus multifasciatus</i> (Quoy & Gaimard, 1825)	AP012314	(SONG <i>et al.</i> , 2014)	AP012314	(SONG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Parupeneus pleurostigma</i> (Bennett, 1831)	JQ350193	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Parupeneus rubescens</i> (Lacepède, 1801)	JF494108	STEINKE, D <i>et al.</i> *		
<i>Parupeneus spilurus</i> (Bleeker, 1854)	DQ107798	(WARD <i>et al.</i> , 2005)		
<i>Parupeneus trifasciatus</i> (Lacepède, 1801)	JQ350181	(HUBERT <i>et al.</i> , 2012)		
<i>Pseudupeneus grandisquamis</i> (Gill, 1863)		Presente estudo		Presente estudo
<i>Pseudupeneus maculatus</i> (Bloch, 1793)		Presente estudo		Presente estudo
<i>Pseudupeneus prayensis</i> (Cuvier, 1829)		Presente estudo		Presente estudo
<i>Upeneichthys porosus</i> (Cuvier, 1829)			GQ412298	(BRALEY <i>et al.</i> , 2010)
<i>Upeneichthys stotti</i> Hutchins, 1990			EU848448	(DEAGLE <i>et al.</i> , 2009)

Espécies	Marcador-Acesso (GenBank) e referência			
	COI	Referência	16S	Referência
<i>Upeneichthys vlamingii</i> (Cuvier, 1829)	DQ107794	(WARD <i>et al.</i> , 2005)	EU848456	(DEAGLE <i>et al.</i> , 2009)
<i>Upeneus japonicus</i> (Houttuyn, 1782)	AB355921.1	(SONG <i>et al.</i> , 2014)	AB355921.1	(SONG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Upeneus moluccensis</i> (Bleeker, 1855)	KC501850	(KESKIN; ATAR, 2013)		
<i>Upeneus parvus</i> Poey, 1852		Presente estudo		Presente estudo
<i>Upeneus pori</i> Ben-Tuvia & Golani, 1989	KF564319	SHAISH, L*		
<i>Upeneus sulphureus</i> Cuvier, 1829	EF609637	(LAKRA <i>et al.</i> , 2011)		
<i>Upeneus tragula</i> Richardson, 1846	AB355920.1	(SONG <i>et al.</i> , 2014)	AB355920.1	(SONG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Upeneus vittatus</i> (Forsskål, 1775)	GU804964	STEINKE, D*		

\* Dados disponíveis no GenBank, mas não publicados

Tabela 5 - Modelos de evolução utilizados para cada marcador isoladamente ou concatenados nos seguintes conjuntos de dados: Família abrangente COI (35 espécies de mullídeos + grupo externo), Família abrangente 16S (15 espécies de mullídeos + grupo externo), Família concatenada (13 espécies de mullídeos com sequências disponíveis para COI e 16S + grupo externo), Gênero *Pseudupeneus* (todos os representantes do gênero *Pseudupeneus* e dois representantes do gênero *Mulloidichthys* como grupo externo, analisados isoladamente e concatenados).

Conjuntos de dados	COI	16S	Cit b	IS7	COI+16S	COI+16S+Cit b	COI+16S+Cit b+IS7
Família abrangente	HKY+G	HKY+G					
Família concatenados					HKY+G		
Gênero <i>Pseudupeneus</i>	HKY+G	K80+G	HKY+G	HKY			
Gênero <i>Pseudupeneus</i> concatenados						GTR+G	GTR+G

Para verificar se as divergências genéticas encontradas entre as espécies do gênero *Pseudupeneus* são semelhantes às encontradas em outros pares de espécies irmãs sujeitas às mesmas barreiras biogeográficas, foram calculados os valores de distância genética utilizando o modelo de evolução (Kimura dois parâmetros) implementado no software MEGA 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013) sem a aplicação de taxas de correção entre os sítios. Essa metodologia é idêntica à utilizada por Lessios (2008) em uma revisão que abordou pares de espécies irmãs formadas durante o surgimento do Istmo do Panamá. A origem das sequências (espécies) utilizadas para essa análise está disponível na Tabela 6.

Tabela 6 - Pares de clados irmãos utilizados para avaliar a influência de barreiras biogeográficas sobre as espécies do gênero *Pseudupeneus*. Destacando o marcador utilizado (IS7), o número de acesso no banco de dados (GenBank) e as bibliografias de referência.

Espécies	Marcador/Acesso (GenBank) e referência	
	IS7	Referência
<i>Pseudupeneus grandisquamis</i> (Gill, 1863)		Presente estudo
<i>Pseudupeneus maculatus</i> (Bloch, 1793)		Presente estudo
<i>Pseudupeneus prayensis</i> (Cuvier, 1829)		Presente estudo
<i>Haemulon steindachneri</i> (Jordan & Gilbert, 1882) (Atlântico)	JQ741875	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Haemulon steindachneri</i> (Jordan & Gilbert, 1882) (Pacífico)	JQ741874	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Conodon nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	JQ741824	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Conodon serrifer</i> Jordan & Gilbert, 1882	JQ741825	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anisotremus virginicus</i> (Linnaeus, 1758)	JQ741819	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anisotremus taeniatus</i> Gill, 1861	JQ741808	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Chaetodon ocellatus</i> Bloch, 1787	FJ167815	(BELLWOOD <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chaetodon humeralis</i> Günther, 1860	FJ167805	(BELLWOOD <i>et al.</i> , 2010)
<i>Anisotremus surinamensis</i> (Bloch, 1791)	JQ740920	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anisotremus interruptus</i> (Gill, 1862)	JQ740910	(TAVERA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Mulloidichthys martinicus</i> (Cuvier, 1829)		Presente estudo
<i>Mulloidichthys dentatus</i> (Gill, 1862)		Presente estudo
<i>Hippocampus reidi</i> Ginsburg, 1933	AY277327	(TESKE <i>et al.</i> , 2004)
<i>Hippocampus algiricus</i> Kaup, 1856	AY277328	(TESKE <i>et al.</i> , 2004)
<i>Hippocampus ingens</i> Girard, 1858	AY277334	(TESKE <i>et al.</i> , 2004)

### 3.3.2 Análises filogeográficas e populacionais

Neste tópico (incluindo resultados e discussões) o significado do termo “população” será operacional e representa os indivíduos de uma espécie, coletados em uma determinada área em um determinado tempo, independente dos níveis de fluxo gênico nestas localidade (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006; SIMON, 2014). As etapas de alinhamento e edição das sequências foram realizadas utilizando a mesma metodologia já descrita para as análises filogenéticas. Para as análises filogeográficas e populacionais foram utilizadas 207 sequências obtidas durante o presente estudo para os dois marcadores mitocondriais (Cit b e RC) e uma obtida no Genbank para o marcador RC (TABELA 7).

Tabela 7 – Marcadores, Citocromo b (Cit b) e Região controle (RC), número de sequências, número de pares de base (pb) e locais de coleta utilizados para os estudos filogeográficos da espécie *Pseudupeneus maculatus*.

<b>Locais de coleta</b>	<b>Cit b (682 pb)</b>	<b>RC (301 pb)</b>
<b>Atol das Rocas</b>	3	
<b>Ceará</b>	27	27
<b>Espírito Santo</b>	21	21
<b>Fernando de Noronha</b>	25	27
<b>Pernambuco</b>	26	30
<b>Caribe</b>		1*

\* Acesso (GenBank) e referência JX951684 (LESSIOS; ROBERTSON, 2013).

Utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), foram calculados os índices de diversidade haplotípica ( $h$ ) (NEI, 1987), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (NEI, 1987) e o teste de neutralidade ( $F_s$ ) (FU, 1996, 1997). Esse mesmo programa também foi utilizado para realizar testes objetivando detectar possíveis níveis de estruturação populacional, utilizando a estatística  $\Phi$  ( $\Phi_{ST}$ ), juntamente com análises de variância molecular (AMOVA) calculadas com 10.000 permutações (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

Redes de haplótipos foram construídas utilizando o programa Network 4.6.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>), mantendo as configurações (pesos) padrões. Os dados foram processados primeiramente através do algoritmo *Median-joining* (BANDELT *et al.*, 1999), seguido da opção de limpeza da rede por máxima parcimônia (POLZIN; DANESHMAND, 2003). Devido a quantidade de amostras (somente 3 espécimes, TABELA 7) o Atol das Rocas foi incluído apenas nas análises de redes de haplótipos.

## 4 RESULTADOS

Não foram encontrados níveis críticos de saturação em nenhum conjunto de dados dos diferentes marcadores. Em todos os casos, os resultados do teste de Xia *et al.* (XIA *et al.*, 2003) apresentaram valores dos índices de saturação de substituição (ISS) significativamente menores do que os valores críticos de saturação (Iss.c) (APÊNDICE A). Em uma outra abordagem, foram analisados os gráficos transições e transversões versus distâncias genéticas (APÊNDICE B), onde também não foram constatados níveis críticos saturação. Dessa forma, esses resultados dão suporte para a aplicação dos dados obtidos em análises filogenéticas.

### 4.1 Filogenia da Família Mullidae

Em um contexto geral, as topologias das árvores nos três métodos de análise (IB, ML e MP) e nos dois marcadores (COI e 16S), sejam eles analisados isoladamente ou concatenados, foram semelhantes (FIGURAS 4, 5, 6) e (APÊNDICE C, 1-6). Considerando as espécies analisadas, a monofilia da maioria dos gêneros foi recuperada. Entretanto, a maior parte das relações filogenéticas entre os gêneros não foram resolvidas ou não apresentaram valores de suporte confiáveis.

Foram constatadas algumas variações nos valores de suporte, como também na posição e recuperação de alguns clados, tanto entre as árvores provenientes dos diferentes marcadores quanto entre árvores construídas com o mesmo marcador, mas que utilizaram diferentes métodos de análise filogenética. As árvores bayesianas foram escolhidas para representar as relações filogenéticas obtidas na presente pesquisa e, quando disponíveis,

os valores de suporte provenientes dos outros métodos de análise (ML e MP) também foram incluídos nas figuras.

#### 4.1.1 Família Mullidae - marcador COI

As árvores provenientes do marcador COI (IB, ML e MP), que incluíram 35 espécies da família (41% das espécies reconhecidas), evidenciaram a monofilia de quatro dos seis gêneros testados. Foram eles: *Upeneus*, *Mulloidichthys*, *Mullus* e *Pseudupeneus* (FIGURA 4). Contudo, a monofilia deste último gênero só alcançou elevado suporte através da inferência bayesiana (94%), ao passo que, por ML, esse suporte foi apenas marginal (33%).

Merece destaque o gênero *Upeneus*, que teve sua monofilia recuperada pelo COI, com dois clados bem apoiados emergindo dentro do clado principal. A espécie *Upeneus parvus*, Poey 1852 não teve sua relação filogenética bem estabelecida em nenhum dos clados (FIGURA 4).

A monofilia do gênero *Parupeneus* não foi recuperada pelo COI com a topologia resultante sugerindo um possível parafiletismo do grupo. Todavia, todas as 16 espécies analisadas para esse gênero se mantiveram fora de todos os outros cinco gêneros estudados.

Não foi possível confirmar a monofilia do gênero *Upeneichthys* devido à limitada abrangência taxonômica disponível para o marcador COI. Na presente pesquisa, esse gênero contou apenas com a espécie *Upeneichthys vlamingii* (Cuvier, 1829). Apesar disso, essa espécie se manteve fora dos outros gêneros analisados (FIGURA 4).

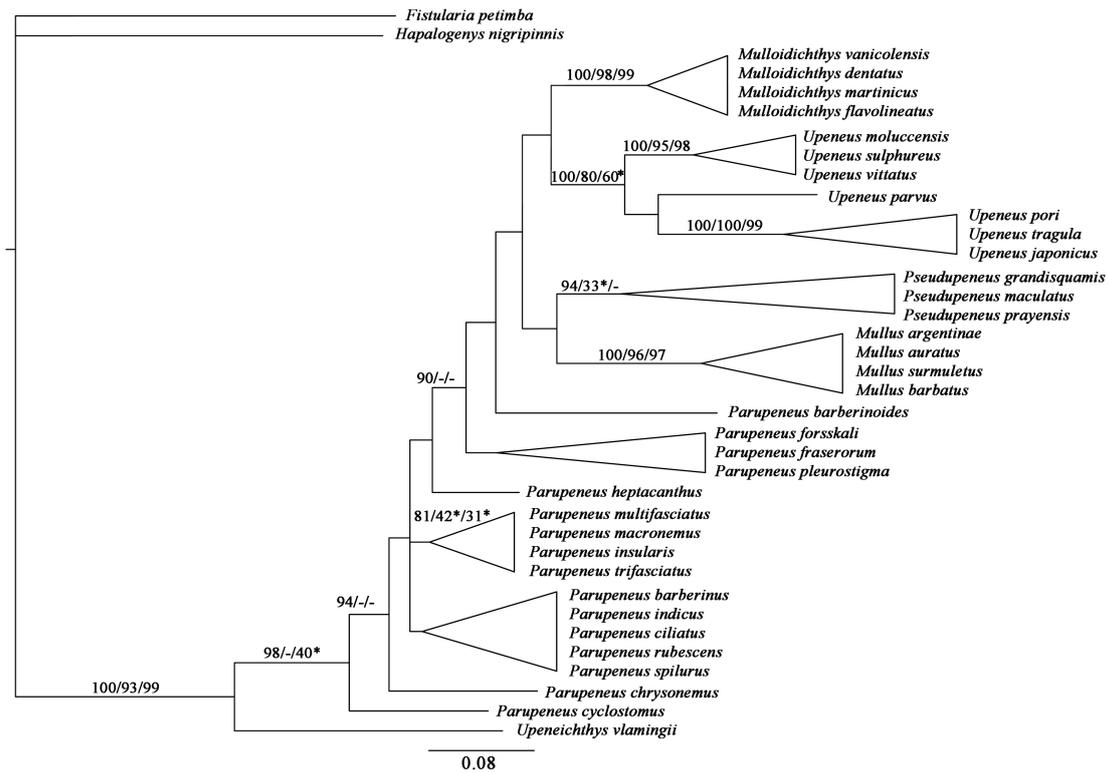


Figura 4 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador COI, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores de suporte menores do que os limites definidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises.

#### 4.1.2 Família Mullidae - marcador 16S

Mesmo utilizando um número bem menor de espécies (15) em relação à análise feita com o marcador COI (35), a monofilia de todos os gêneros recuperados na análise anterior também foram recuperados pelo marcador 16S (FIGURA 5). Assim como nas análises com COI, a monofilia do gênero *Pseudupeneus* não foi recuperado por todos os métodos de análises filogenéticas. Para o 16S, a monofilia desse gênero foi recuperada somente pela análise bayesiana, ainda assim, com um suporte apenas marginal (58%) (FIGURA 5).

O gênero *Upeneichthys*, que foi representado na árvore de COI por apenas uma espécie, para o 16S foi representando por três espécies das cinco espécies válidas. A monofilia desse gênero foi confirmada com suporte máximo nos três métodos de análise (FIGURA 5).

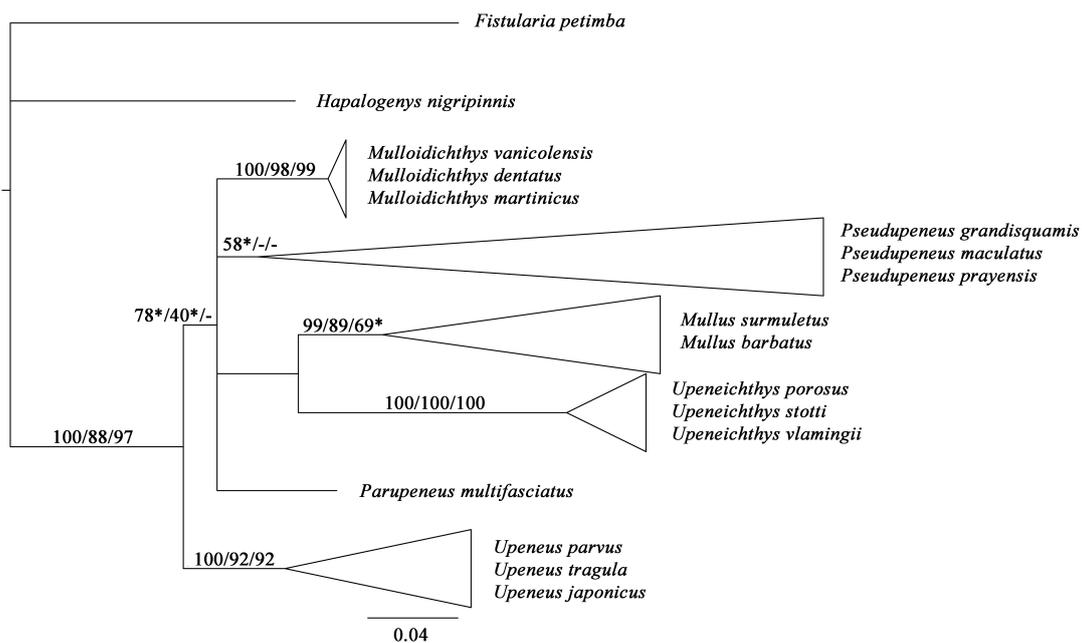


Figura 5 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador 16S, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores de suporte menores do que os limites definidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises.

#### 4.1.3 Família Mullidae - concatenando COI e 16S

Utilizando sequências de 13 espécies, incluindo representantes de todos os gêneros reconhecidos, foram realizadas análises concatenando sequências dos marcadores COI e 16S. A monofilia dos gêneros, reconhecidas quando cada marcador foi

analisado isoladamente, também foi confirmada pelas análises concatenadas (FIGURA 6). Além disso, foram constatados aumentos nos valores suporte em muitos casos, reforçando a confiabilidade dos resultados apresentados. Um exemplo foi o gênero *Pseudupeneus*, que apresentou suporte máximo para IB, e um suporte fraco, contudo preservando a topologia, para ML (55%).

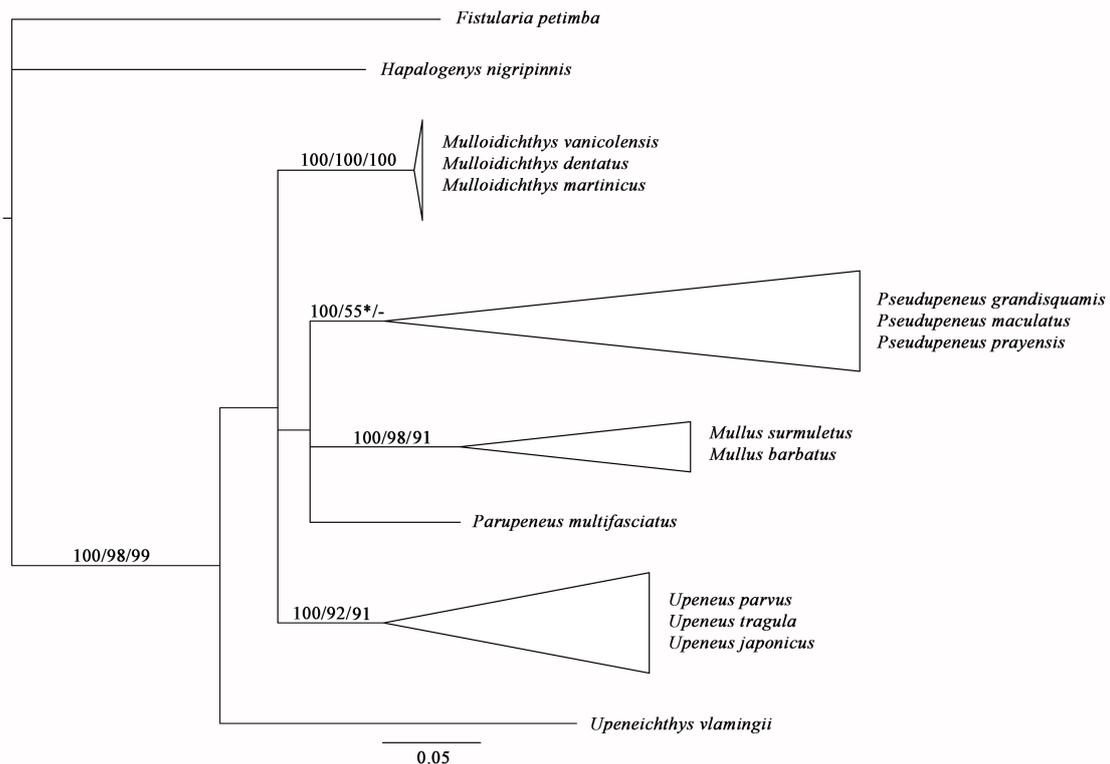


Figura 6 - Árvore filogenética da família Mullidae para os marcadores COI e 16S concatenados, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores maiores que 80% (IB) e *bootstrap* maiores que 70% para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). - representa ausência de suporte para o método de análise e \* representa valores de suporte menores do que os limites definidos, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises.

#### 4.2 Filogenia do Gênero *Pseudupeneus*

Foram encontradas topologias conflitantes entre árvores provenientes dos diferentes marcadores, sendo eles analisados isoladamente ou concatenados. A maioria das árvores proveniente dos marcadores IS7 e 16S resultou na formação de um clado

constituído pelas espécies irmãs *P. maculatus* e *P. prayensis*, tendo *P. grandisquamis* como clado irmão desse primeiro. Todavia, as árvores provenientes do marcador COI, indicaram a espécie *P. grandisquamis* como irmã de *P. maculatus* (FIGURA 7).

As árvores originadas de análises utilizando o marcador Cyt b ou somente os marcadores mitocondriais concatenados não apresentaram resultados confiáveis, portanto foram consideradas como não resolvidas (FIGURA 7). Por outro lado, a maioria das árvores resultantes das análises concatenando todos os marcadores, mitocondriais e nuclear, totalizando 2.451 pb, resultaram em uma topologia igual àquela mais frequentemente observada quando cada marcador foi analisado isoladamente (*P. maculatus* irmã de *P. prayensis*) (FIGURAS 7, 8). Por esse motivo, essa hipótese foi assumida como a mais provável para representar as relações entre as espécies do gênero *Pseudupeneus*.

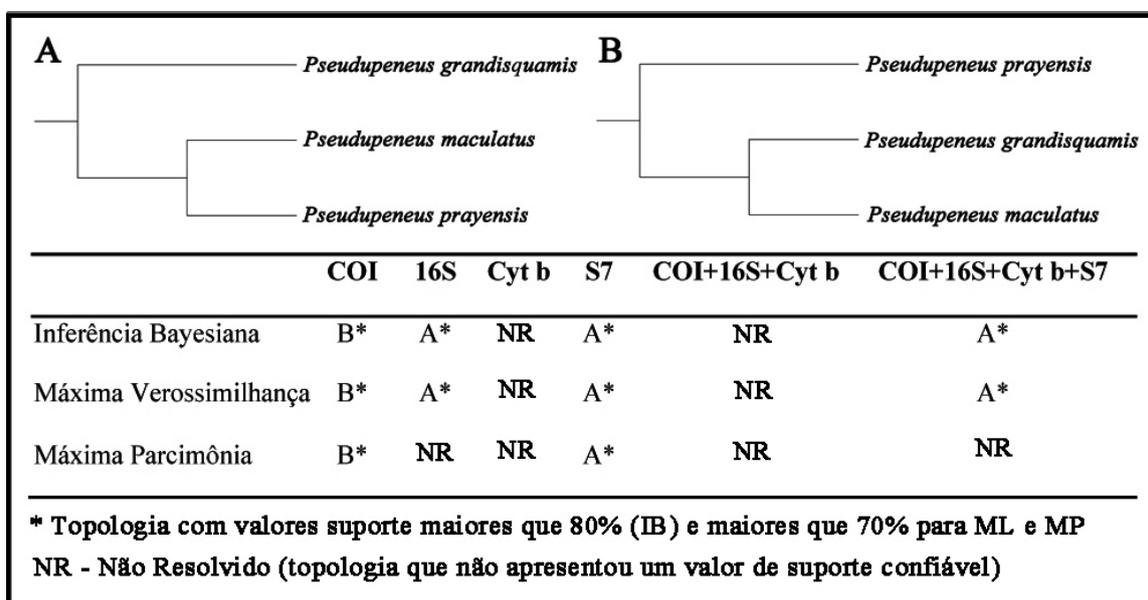


Figura 7 - Topologias conflitantes entre os diferentes marcadores e métodos de análise, sejam eles analisados isoladamente ou concatenados.

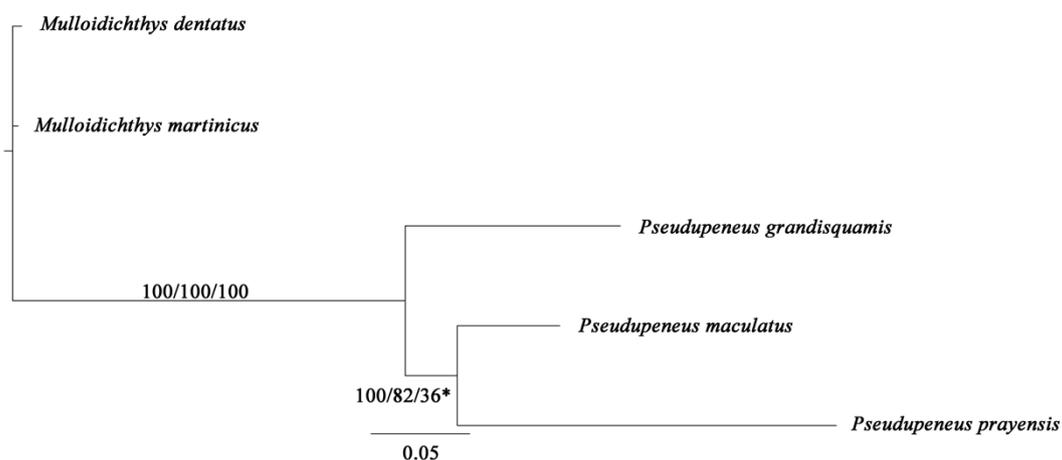


Figura 8 - Árvore filogenética do gênero *Pseudupeneus* para os marcadores COI, 16S, Cit b e IS7 concatenados, utilizando Inferência Bayesiana (IB). Os valores suporte, probabilidades posteriores para IB e *bootstrap* para ML e MP estão destacados na figura (IB/ML/MP). \* representa um valor suporte baixo, contudo mantendo a mesma topologia em diferentes análises.

#### 4.3 Espécies irmãs dentro do gênero *Pseudupeneus* e o soerguimento do Istmo do Panamá

Todas as árvores filogenéticas provenientes do primeiro intron IS7 apresentaram bom suporte e a mesma topologia assumida como sendo a mais provável para representar as relações entre as espécies do gênero *Pseudupeneus* (FIGURAS 7, 8). Por esse motivo, foi assumido que esse marcador é o que melhor representou a filogenia do grupo. Dentro desse contexto, foram calculados os valores de distância genética (K2P) entre os componentes do gênero *Pseudupeneus* para esse marcador. Também foram calculados os valores de distância genética entre outros cinco pares de clados irmãos separados pelo Istmo do Panamá (TABELA 8).

Os valores de distância genética observados entre de clados irmãos do gênero *Pseudupeneus*, para o marcador IS7, foram no mínimo, sete vezes maiores do que os valores observados nos outros clados separados pelo Istmo do Panamá (TABELA 8).

Tabela 8 - Distâncias genéticas calculadas para o marcador IS7, utilizando o modelo (K2P - Kimura dois-parâmetros), entre cinco pares de clados irmãos separados pelo Istmo do Panamá e um par separado pela Barreira Mesoatlântica.

Distribuição / Espécies		Distância (K2P) em %
Pacífico	Atlântico	IS7
<i>Pseudupeneus grandisquamis</i>	<i>Pseudupeneus maculatus</i> / <i>Pseudupeneus prayensis</i>	13,71 / 13,15
<i>Conodon serrifer</i>	<i>Conodon nobilis</i>	1,90
<i>Haemulon steindachneri</i> (Pacífico)	<i>Haemulon steindachneri</i> (Atlântico)	1,85
<i>Anisotremus taeniatus</i>	<i>Anisotremus virginicus</i>	1,26
<i>Anisotremus interruptus</i>	<i>Anisotremus surinamensis</i>	0,62
<i>Mulloidichthys dentatus</i>	<i>Mulloidichthys martinicus</i>	0,23
<b>Oeste do Atlântico</b>	<b>Leste do Atlântico</b>	
<i>Pseudupeneus maculatus</i>	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	5,78

Com relação à Barreira Mesoatlântica, os valores de distância genética entre o par de espécies irmãs do gênero *Pseudupeneus* (*P. maculatus* e *P. prayensis*), foi 2,3 vezes menor que o valor médio de distância genética observado entre os clados desse mesmo gênero separados pelo Istmo do Panamá (TABELA 8).

#### 4.4 Filogeografia do gênero *Pseudupeneus*

Para o marcador região controle (RC) foram obtidas ao todo 105 sequências com 304 pares de base cada. Destas, foram identificados 94 sítios polimórficos resultando em 80 haplótipos. Um número similar de sequências (99) foram obtidas para o marcador Citocromo b (Cit b), com 682 pares de base, 14 sítios polimórficos e 15 haplótipos.

##### 4.4.1 Diversidade genética e estrutura populacional

Os valores encontrados dos índices  $h$  e  $\pi$  nos diferentes marcadores (RC e Cit b) não mostraram diferenças entre as localidades analisadas (TABELA 9). A única exceção foi o baixo valor de  $h$  encontrado para Cit b no Espírito Santo. Esse valor foi menor que o valor encontrado para o Ceará; todavia, esse padrão não se repete para o RC. A diversidade haplotípica ( $h$ ) no marcador RC foi muito alta, com haplótipos únicos

presentes em 70 a 97% dos indivíduos nas diferentes populações analisadas. Para o marcador Cit b, haplótipos únicos estavam presentes em 14 a 32% dos indivíduos nas diferentes populações. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e diversidade haplotípica ( $h$ ) também foram menores para o marcador Cit b (TABELA 9).

Tabela 9 - Tamanho da amostra (n), Número de haplótipos e índices: diversidade de haplotípica ( $h \pm$  erro padrão) e diversidade de nucleotídica ( $\pi \pm$  erro padrão) para as quatro localidades analisadas.

Marcadores/Locais	n	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica h	Diversidade nucleotídica $\pi$
<b>RC 301 pb</b>				
Ceará	27	21	0,9658 +/- 0,0253	0,047074 +/- 0,024249
Pernambuco	30	29	0,9977 +/- 0,0094	0,045191 +/- 0,023230
Fernando de Noronha	27	19	0,9630 +/- 0,0214	0,040842 +/- 0,021190
Espírito Santo	21	20	0,9952 +/- 0,0165	0,050031 +/- 0,026004
<b>Cit b 682 pb</b>				
Ceará	27	7	0,6268 +/- 0,0945	0,002590 +/- 0,001725
Pernambuco	26	7	0,4708 +/- 0,1194	0,001403 +/- 0,001102
Fernando de Noronha	25	8	0,4900 +/- 0,1230	0,001163 +/- 0,000971
Espírito Santo	21	3	0,3381 +/- 0,1200	0,001508 +/- 0,001171

Os resultados obtidos indicaram fluxo gênico irrestrito entre todas as populações analisadas para os dois marcadores, com valores de  $\Phi_{ST}$  negativos ou muito baixos, sendo a maioria não significativamente diferentes de zero (TABELA 10). A única exceção foi para o marcador RC entre as populações do Ceará e Fernando de Noronha, que mesmo encontrando um valor baixo de  $\Phi_{ST}$ , este foi significativamente diferente de zero ( $\Phi_{ST} = 0,04958$ ,  $P < 0.05$ ). Também entre essas mesmas localidades foi encontrado o maior valor de  $\Phi_{ST}$  para o marcador Cit b (0,07597). Este valor, mesmo não sendo significativo ( $P > 0.05$ ), é, no mínimo, três vezes maior do que os obtidos entre todas as outras populações analisadas (TABELA 10). Esses resultados podem indicar a existência uma fraca limitação de fluxo gênico entre essas duas localidades ou simplesmente ser um artefato relacionado com o tamanho amostral utilizado na presente pesquisa.

Tabela 10 - Valores de  $\Phi_{ST}$  para pares de populações de *Pseudupeneus maculatus*.

Marcador/Localidade	Ceará	Pernambuco	Fernando de Noronha
<b>RC (301 pb)</b>			
Ceará	-		
Pernambuco	-0,02408	-	
Fernando de Noronha	0,04958*	0,03196	-
Espírito Santo	-0,01885	-0,02528	0,00345
<b>Cit b (682 pb)</b>			
Ceará	-		
Pernambuco	0,02505	-	
Fernando de Noronha	0,07597	-0,01409	-
Espírito Santo	-0,00445	-0,02440	0,02523

\* indica significância em um nível de 95%

Os resultados da análise da variância molecular (AMOVA) entre todas as localidades confirmaram a ausência de estruturação entre as populações analisadas, indicando que a maior porcentagem de variação genética está dentro (RC 95,04%; Cit b 98,04%) e não entre as populações (RC 4,96%; Cit b 1,96%).

Os resultados do teste de neutralidade ( $F_s$ ), considerando todos os indivíduos de todas as populações, revelaram valores negativos e significativos para os dois marcadores (RC -24,146; Cit b -9,185;  $P < 0,02$ ).

A rede de haplótipos proveniente do marcador RC, a partir de 105 sequências distribuídas entre as localidades conforme a Tabela 7, com o acréscimo de uma sequência proveniente do Caribe, identificou pelo menos quatro subgrupos principais (I, II, III e IV) destacados na Figura 9. Em todos os subgrupos principais, foram encontrados representantes de todas as populações estudadas, o que está em conformidade com os resultados de estrutura populacional apresentados anteriormente, que indicou fluxo gênico irrestrito entre as localidades.

No primeiro subgrupo (I) foi encontrado o haplótipo mais frequente para o RC, sendo esse presente em todas as populações amostradas. Para este haplótipo, foi

constatada uma predominância de indivíduos do Ceará em relação às outras localidades (FIGURA 9). Para o segundo subgrupo (II), observou-se que nos haplótipos centrais (mais frequentes) houve uma predominância ou total composição por representantes da população insular (Fernando de Noronha). Também foi nesse subgrupo que se ligou o único haplótipo do Caribe analisado para esse marcador.

No terceiro subgrupo (III), o haplótipo central é constituído somente por indivíduos de populações continentais (Ceará e Espírito Santo) com predominância de indivíduos do Ceará. Nesse mesmo subgrupo também estão presentes vários haplótipos periféricos da outra população continental (Pernambuco) e somente um único haplótipo insular. O subgrupo IV foi formado por haplótipos únicos provenientes de todas as localidades analisadas.

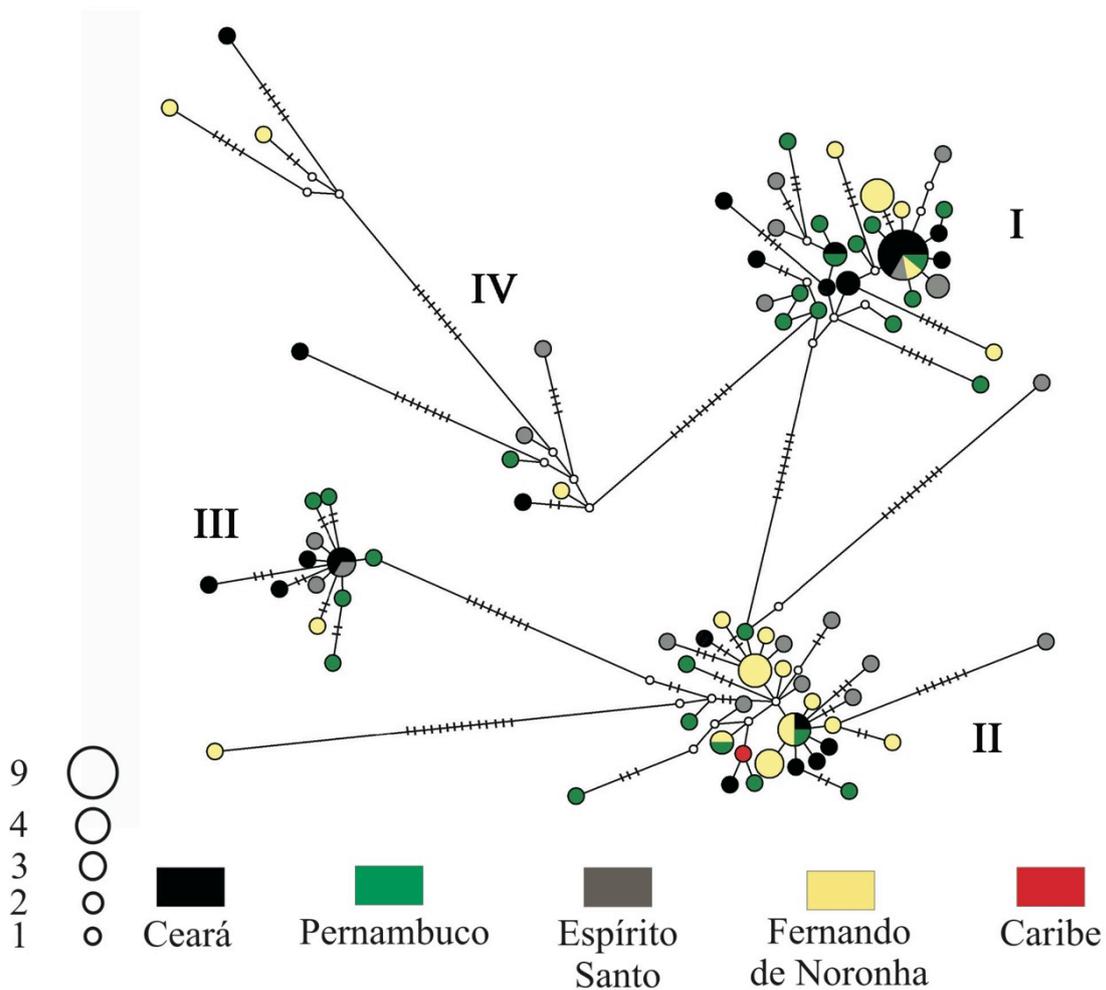


Figura 9 - Rede de haplótipos (método *median-joining*) com posterior tratamento por máxima parcimônia da região controle (RC) para a espécie *Pseudupeneus maculatus*. Os comprimentos dos ramos são proporcionais ao número de mutações. Nos casos onde ocorreu mais de uma mutação, a quantidade é representada por linhas transversais. O tamanho dos círculos são proporcionais às frequências de cada haplótipo e as partições (em cores) dentro dos círculos representam a proporção dos haplótipos proveniente de cada localidade. Pequenos círculos brancos representam os vetores médios (haplótipos extintos ou não amostrados) e número romanos destacam os quatro subgrupos.

Para o marcador Cit b, o haplótipo central (haplótipo I na FIGURA 10) representou 70% de todas as sequências analisadas. Além disso, esse haplótipo está distribuído de forma homogênea entre todas as populações. O Atol das Rocas foi representado nessa pesquisa por somente três sequências: duas fizeram parte do haplótipo central e a outra é um haplótipo único para essa localidade.

Os dois outros haplótipos mais frequentes para o marcador Cit b (II e III na FIGURA 10) também apresentaram representantes de todas (II) ou quase todas (III) as populações analisadas. Em ambos os haplótipos (II e III) foi constatada uma predominância de indivíduos do Ceará. Na rede de haplótipos do Cit b foram adicionadas sequências das outras duas espécies do gênero *Pseudupeneus* (*P. prayensis* e *P. grandisquamis*) objetivando identificar a direção das linhagens filogeográficas. Os resultados obtidos revelaram que os haplótipos II e III apresentaram maior afinidade com *P. grandisquamis* (CAPG). Por outro lado, observou-se uma maior afinidade entre os haplótipos exclusivos de Fernando de Noronha com a espécie *P. prayensis* (CVPP) (FIGURA 10) que, segundo a hipótese filogenética apresentada no presente estudo, é a espécie irmã de *P. maculatus* (FIGURAS 7, 8). Esse resultado nos fornece indícios evolutivos e geográficos a respeito da especiação mais recente dentro desse grupo.

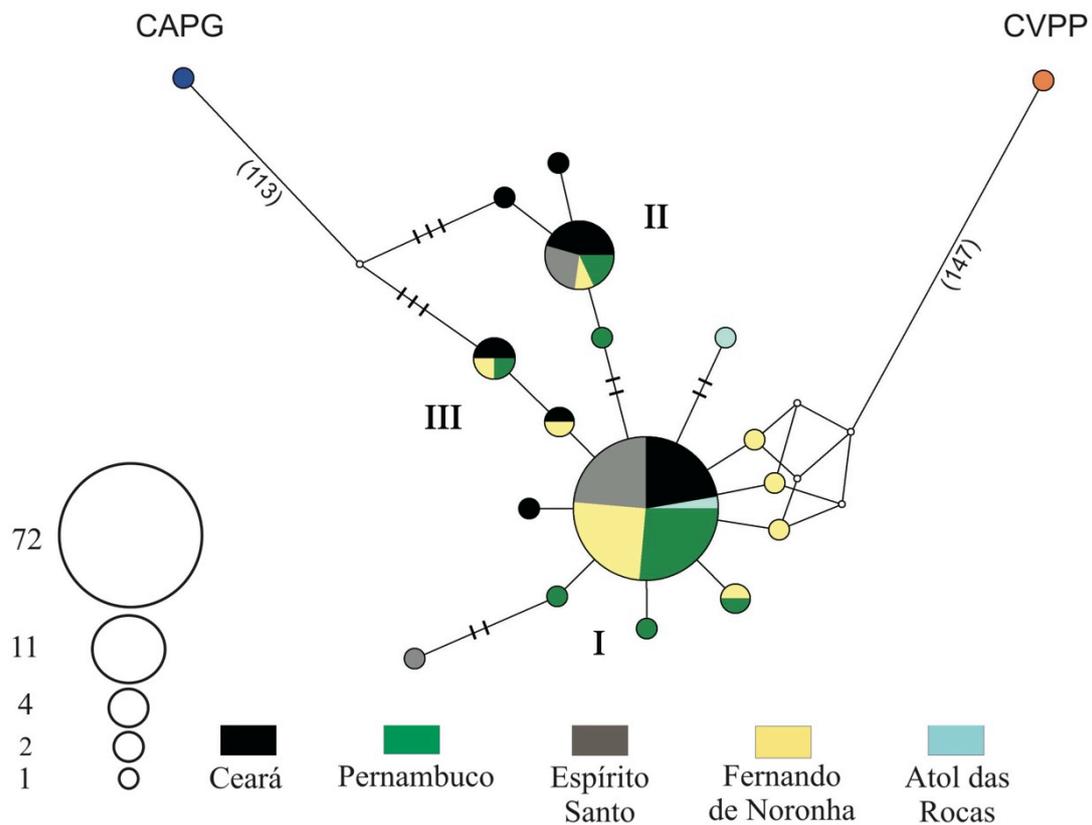


Figura 10 - Rede de haplótipos (método *median-joining*) com posterior tratamento por máxima parcimônia para o gene *Cit b* para a espécie *Pseudupeneus maculatus*. *P. Prayensis* (CVPP) e *P. grandisquamis* (CAPG) representam grupos externos. Comprimentos dos ramos são proporcionais ao número de mutações. Nos casos onde ocorreu mais de uma mutação, a quantidade é representada por linhas transversais ou é escrita entre parêntesis. O tamanho dos círculos são proporcionais às frequências de cada haplótipo e as partições (em cores) dentro dos círculos representam a proporção dos haplótipos proveniente de cada localidade. Pequenos círculos brancos representam os vetores médios (haplótipos extintos ou não amostrados) e os números romanos destacam os três haplótipos mais frequentes.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Família Mullidae

Segundo Uiblein e Heemstra (2010), para os peixes da família Mullidae, os recentes estudos moleculares têm, em grande parte, confirmado as conclusões de estudos morfológico anteriores. Seguindo essa tendência, os resultados moleculares aqui apresentados confirmaram a monofilia de cinco dos seis gêneros anteriormente reconhecidos por Kim (2002) em uma filogenia utilizando dados morfológicos (FIGURA 11).

Utilizando o marcador COI não foi possível confirmar a monofilia do gênero *Parupeneus*, sendo ainda constatados sinais de parafilia dentro do táxon. *Parupeneus* é o segundo gênero mais especioso dentro de Mullidae (32 espécies válidas) (FROESE; PAULY, 2014), sendo também o gênero melhor representado em número de espécies na presente pesquisa para o marcador COI (16). Mesmo com o representativo número de espécies analisadas, observou-se que nenhuma delas agrupou em qualquer um dos outros cinco gêneros analisados (FIGURA 4). Morfológicamente, *Parupeneus* é apoiado por duas apomorfias: presença de crista frontal e projeção ectopterigoide (KIM, 2002). Além disso o gênero pode ser reconhecido pela presença uma única fileira de dentes cônicos nas maxilas e ausência de dentes no vômer e palato (RANDALL; HEEMSTRA, 2009). Os representantes desse gênero compartilham ainda os seguintes caracteres merísticos: primeira nadadeira dorsal com oito espinhos e segunda nadadeira dorsal com nove raios; sete raios na nadadeira anal; quinze raios na nadadeira caudal; um espinho e cinco raios

na nadadeira pélvica e vinte sete ou vinte oito escamas na linha lateral (RANDALL; KING, 2009).

Não é prudente, com base nos resultados da filogenia molecular de *Parupeneus* aqui apresentados, refutar com segurança a hipótese prévia de monofilia desse gênero (KIM, 2002). Em alguns casos o mesmo marcador mitocondrial pode apresentar variações no sinal filogenético entre grupos taxonômicos intimamente relacionados, ou seja, o marcador obtém sucesso em recuperar a história evolutiva de um grupo e não consegue obter êxito em grupos próximos (HAVIRD; SANTOS, 2014). Todavia, acredita-se que uma maior atenção deva ser dada às relações filogenéticas de *Parupeneus*, e se possível utilizar outros marcadores moleculares além do COI.

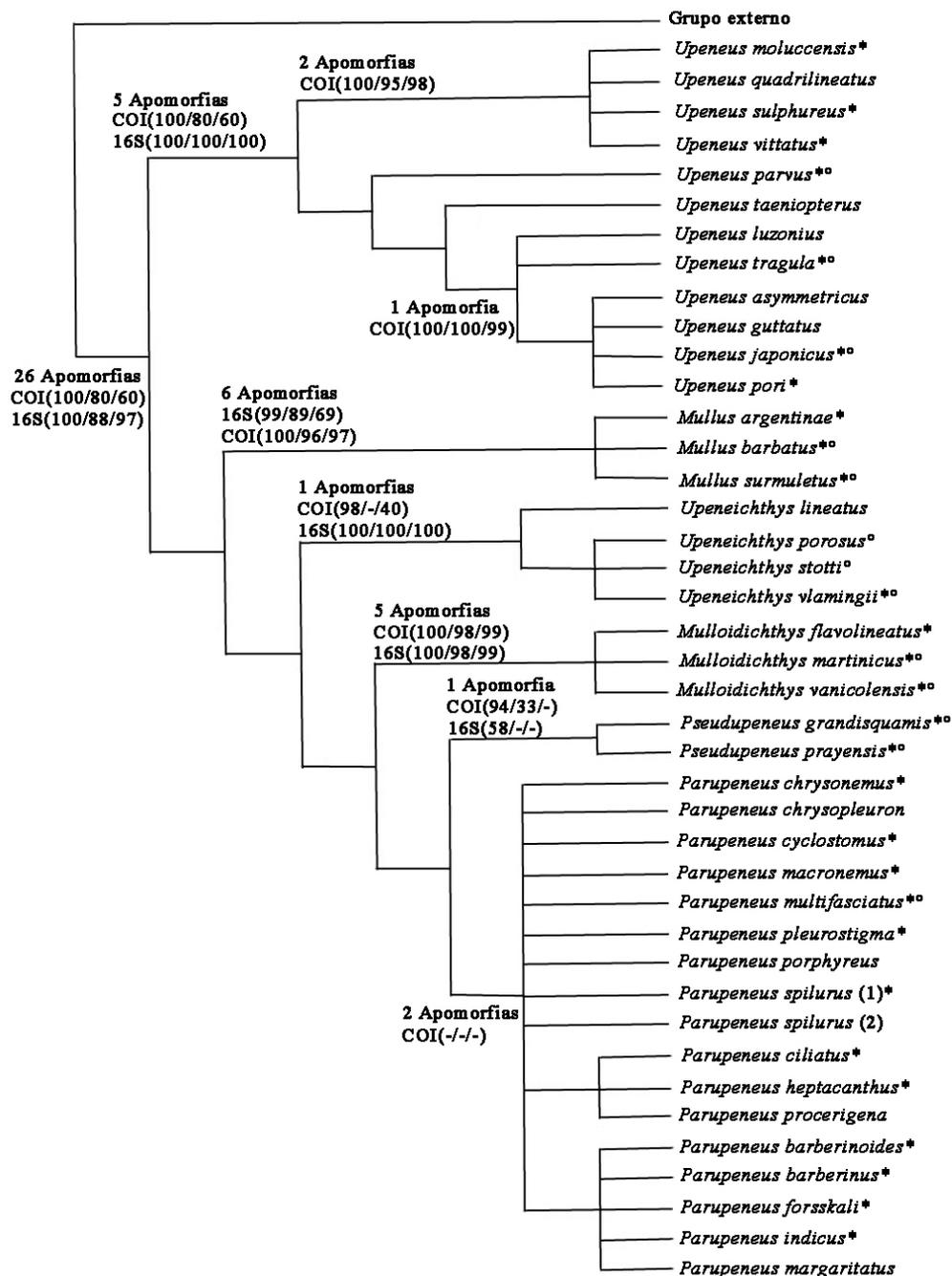


Figura 11 - Árvore filogenética baseada em caracteres morfológicos adaptada de Kim (2002), destacando o número de apomorfias que suportam alguns clados, e os valores de suporte obtidos, no presente estudo, para os referidos clados, nos três métodos de análise filogenética (IB/ML/MP), para os dois marcadores (COI e 16S). \* indica que a espécie foi incluída na análise utilizando COI e ° espécie incluída na análise utilizando 16S. - significa ausência de suporte.

A topologia encontrada para o gênero *Upeneus* foi a mesma em todos os métodos de análise, onde emergiram dois subclados bem suportados (FIGURA 4). Baseado em caracteres morfológicos e utilizando um número maior de espécies Kim (2002) encontrou uma topologia semelhante para esse gênero (FIGURA 11).

Sinais indicando subdivisões dentro de *Upeneus* já haviam sido identificadas por meio de filogenias moleculares mitocondriais (BOS, 2014) e nucleares (GOLANI; RITTE, 1999). Dessa forma, constatou-se que tanto em análises filogenéticas baseadas em morfologia (KIM, 2002) quanto em trabalhos que utilizaram dados moleculares (incluindo o presente estudo), pelo menos dois subclados emergiram dentro de *Upeneus*.

Frente as evidências de subdivisão desse clado, Golani e Ritter (1999) sugeriram um apoio a proposta de Kühlmorgen-Hille (1974), que recomendou dividir *Upeneus* em dois subgêneros. O primeiro, *Upeneus (Upeneus)*, é caracterizado por espécies que apresentam entre cinco e sete linhas verticais de escamas entre as nadadeiras dorsais e 12 linhas de escamas verticais na parte superior do pedúnculo entre a segunda nadadeira dorsal e a nadadeira caudal. Esse subgênero incluiria as espécies *Upeneus moluccensis* (Bleeker 1855), *Upeneus sulphureus* Cuvier 1829, *Upeneus vittatus* (Forsskål 1775), dentre outras. O segundo subgênero, *Upeneus (Penon)*, é caracterizado por espécies com quatro linhas verticais de escamas entre as nadadeiras dorsais e 10 linhas de escamas verticais na parte superior do pedúnculo caudal, incluindo as espécies *Upeneus tragula* Richardson 1846, *Upeneus japonicus* (Houttuyn 1782), dentre outras.

Ao verificar a contagem das escamas na espécie *Upeneus pori* Ben-Tuvia & Golani 1989, (BEN-TUVIA; GOLANI, 1989), constatou-se que ela se enquadra no subgênero *Penon*, resultado este em conformidade com os resultados do presente trabalho (FIGURA 4). Já a espécie *Upeneus parvus* Poey 1852, que apresentou sete

linhas de escamas entre as nadadeiras dorsais e 10 linhas de escamas entre a segunda dorsal e a nadadeira caudal, não se adequou a nenhum dos dois subgêneros, pois inclui caracteres de ambos e pode representar uma outra subdivisão dentro do gênero.

As sugestões de Golani e Ritter (1999) e Kühlmorgen-Hille (1974) se ajustam aos nossos resultados (ver topologia de *Upeneus* na FIGURA 4). No entanto, deve ser feita uma ressalva. Na descrição original do gênero monotípico *Penon*, o autor descreve esse gênero apresentando cinco escamas entre as nadadeira dorsais (WHITLEY, 1941), valor esse que não se ajusta ao sugerido por Kühlmorgen-Hille (1974) para caracterizar o subgênero *Penon* (quatro escamas). Dessa forma, os resultados aqui apresentados reforçam a manutenção de subdivisões dentro de *Upeneus*; todavia, a nomenclatura do subgênero *Penon* deve ser revista. Além disso, dados de eletroforese de isoenzimas revelaram divergência genética entre os subclados de *Upeneus*, compatíveis com os valores encontrados entre alguns gêneros dessa família (GOLANI; RITTE, 1999).

A árvore filogenética do marcador 16S corroborou, em sua maior parte, a árvore obtida com o COI. Além disso, com o 16S, foi possível confirmar a monofilia do gênero *Upeneichthys*, resultado esse que se apresenta em concordância com a filogenia baseada em morfologia (KIM, 2002).

## 5.2 Gênero *Pseudupeneus*

Diferentes topologias encontradas por diferentes marcadores, como no presente estudo, não são uma situação incomum. Árvores filogenéticas construídas utilizando marcadores mitocondriais distintos, para o mesmo conjunto de organismos, podem gerar resultados discordantes, sendo difícil saber se alguma dessas árvores melhor representa a história evolutiva do grupo estudado (RUSSO *et al.*, 1996). A adição de marcadores

independentes, como por exemplo a inclusão de *loci* nucleares, podem produzir topologias mais precisas e auxiliar na escolha de hipóteses filogenéticas mais confiáveis (HAVIRD; SANTOS, 2014).

Hipóteses filogenéticas geradas por múltiplos marcadores podem ser obtidas por duas estratégias diferentes: (1) os marcadores são concatenados em um único alinhamento ou (2) cada marcador é analisado separadamente com posterior elaboração de uma árvore consenso, sendo a primeira estratégia, na maioria dos casos, a que produz árvores mais precisas (GADAGKAR *et al.*, 2005). No presente estudo foram aplicadas as duas estratégias e em ambos os casos a topologia apresentada na Figura 8 foi a que prevaleceu.

A ausência de sobreposição das áreas de ocorrência das três espécies de *Pseudupeneus* atualmente reconhecidas (FIGURA 2), sugere que as barreiras biogeográficas (Istmo do Panamá e Barreira Mesoatlântica) exercem forte influência na evolução desse grupo. No caso específico do Istmo Panamá, seu soerguimento é, há muito tempo, um reconhecido evento vicariante, sendo atribuída a essa barreira, a formação de vários pares de clados irmãos de peixes costeiros (JORDAN, 1908; BERMINGHAM *et al.*, 1997; LESSIOS, 2008).

Os resultados apresentados na Tabela 8 revelaram que os valores de distância genética observados entre os clados de *Pseudupeneus* foram muito maiores do que os valores observados entre todos os outros pares de espécies irmãs separadas pelo Istmo do Panamá que foram analisados no presente estudo. Este fato pode estar relacionado, dentre outros fatores, a um maior tempo de separação entre os clados. Estudos envolvendo o cálculo de distâncias genéticas entre pares de espécies irmãs separadas pelo Istmo, como a presente pesquisa, mostraram que o intervalo de tempo transcorrido entre o início da

formação do Istmo e a sua total conclusão (aproximadamente 12 milhões de anos) pode ter influenciado de maneira diferente a formação dos pares de espécies irmãs (KNOWLTON; WEIGT, 1998; LESSIOS, 2008; TAVERA *et al.*, 2012; LESSIOS; ROBERTSON, 2013). Além disso, após a separação, os táxons podem apresentar diferentes tamanhos efetivos de população, diferentes taxas de mutação e estarem sujeitos a pressões de seleção distintas. Cada um desses fatores, ou mesmo a combinação de alguns deles, pode proporcionar diferenças ainda mais acentuadas entre os valores de distância genética calculados entre pares de espécies irmãs (RIDLEY, 2006; LESSIOS, 2008).

O valor de distância calculado entre as espécies separadas pela Barreira Mesoatlântica, *P. maculatus* e *P. prayensis* (5,78), foi menor do que os valores encontrados entre os clados de *Pseudupeneus* separados pelo Istmo do Panamá (13,43). A Barreira Mesoatlântica pode ser vencida por espécies com maior capacidade de dispersão, sendo reconhecidas até o momento 112 espécies de peixes recifais com distribuição transatlântica (FLOETER *et al.*, 2008). Para algumas dessas espécies, como *Mulloidichthys martinicus*, que também é da família Mullidae, já foi verificada a presença de fluxo gênico, ainda que baixo, entre populações separadas pela Barreira Mesoatlântica (LESSIOS; ROBERTSON, 2013). Diante desses dados, acredita-se que o processo de especiação por dispersão tenha sido responsável pela formação do par *P. maculatus* e *P. prayensis* estudado na presente pesquisa.

A especiação por dispersão através da Barreira Mesoatlântica também foi proposta, com base em dados moleculares, como o caminho mais provável para explicar o padrão filogenético encontrado entre o par de espécies irmãs *Clepticus brasiliensis* Heiser, Moura & Robertson 2000 e *Clepticus africanus* Heiser, Moura & Robertson 2000

(BELDADE *et al.*, 2009). Dessa forma, tanto as espécies do gênero *Clepticus*, mencionadas anteriormente, quanto as de *Pseudupeneus* (presente estudo) estão em concordância com a teoria de Briggs (1974), posteriormente reforçada por Floeter *et al.* (2008), que propõe eventos de dispersão como principais promotores de especiação através da Barreira Mesoatlântica.

Considerando a atual distribuição geográfica do gênero *Pseudupeneus* (Pacífico oriental, Atlântico Ocidental e Atlântico oriental) (FIGURA 2), incluindo uma recente colonização do Mediterrâneo por *P. prayensis* via Estreito de Gibraltar (AZZOUZ *et al.*, 2011), e a hipótese filogenética proposta na presente pesquisa, pode-se sugerir o seguinte cenário evolutivo: o gênero *Pseudupeneus* provavelmente surgiu no Novo Mundo (ambos os lados da América tropical), assim como outros gêneros de peixes recifais (FLOETER *et al.*, 2008), antes da formação do Istmo do Panamá. O nó mais basal, e consequentemente mais antigo da filogenia, juntamente com a ausência desse gênero nos oceanos Índico e restante do Pacífico, onde se encontram as assembleias de peixes recifais mais estáveis e diversos do planeta (BOWEN *et al.*, 2013; PELLISSIER *et al.*, 2014), reforçam essa teoria. Um segundo nó, mais recente que o primeiro, mostra a formação do par de espécies mais derivadas (*P. maculatus* e *P. prayensis*), provavelmente originadas a partir de dispersão através da Barreira Mesoatlântica. A dispersão através dessa barreira é reconhecida pelo importante papel na recente diversificação dos peixes recifais do Atlântico (FLOETER *et al.*, 2008).

### 5.3 Filogeografia de *Pseudupeneus maculatus*

O uso de marcadores moleculares com velocidades de evolução diferentes podem retratar momentos distintos da história evolutiva de uma espécie (RUSSO *et al.*, 2012). Dessa forma, é aconselhável, a utilização de mais de um marcador (DIBATTISTA *et al.*, 2012). A presente pesquisa utilizou dois marcadores mitocondriais com diferentes velocidades de evolução: (1) *Cyt b*, um gene codificador de proteína e (2) *RC*, uma região não codificante também chamada de hipervariável devido a sua alta taxa de mutação (HELFMAN *et al.*, 2009). Ambos confirmaram o fluxo gênico irrestrito entre as populações estudadas, resultado este que reforça a confiabilidade na estrutura populacional encontrada.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que as relações entre as populações estudadas de *P. maculatus* não obedecem as mesmas forças que definiram subdivisões da Província Brasileira, sugeridas em análises baseadas na composição e/ou abundância das espécies (FLOETER; GASPARINI, 2000; FLOETER *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004; FEITOZA *et al.*, 2005; FREITAS; LOTUFO, 2014). Ou seja, características ecológicas dessa espécie provavelmente exercem forte influência sobre a manutenção da uniformidade populacional ao longo da província. Assim, a ausência de estruturação populacional de *P. maculatus* pode ser resultado da combinação entre uma elevada capacidade de dispersão da espécie, condições oceanográficas e ecológicas favoráveis e ausência de barreiras efetivas para essa espécie. A combinação desses fatores já foi sugerida em outros estudos para justificar a ausência de estruturação populacional em peixes recifais (HELFMAN *et al.*, 2009).

Com relação à capacidade de dispersão, não foram encontrados estudos específicos sobre o tempo de duração larval de *P. maculatus*. Contudo, em outras

espécies de mulídeos, esse tempo foi estimado entre 24 e 50 dias (MATIAS *et al.*, 2013; LESSIOS; ROBERTSON, 2013; SZABÓ *et al.*, 2014). A capacidade de dispersão de *P. maculatus* é ainda potencializada pela presença de um estágio juvenil pelágico até cerca de 61 mm (CALDWELL, 1962). Mesmo reconhecendo que o tempo de duração larval isoladamente não é um bom preditor da magnitude do fluxo gênico (WEERSING; TOONEN, 2009), acredita-se que o período larval somado ao estágio juvenil pelágico provavelmente ajudou a moldar a atual homogeneidade populacional revelada na presente pesquisa. Além disso, o hábito alimentar generalista, a tolerância a variações de temperatura e o tamanho do corpo dos indivíduos adultos também podem ter contribuído para manter o padrão de panmixia ao longo dos locais de amostragem (LUIZ *et al.*, 2012; SZABÓ *et al.*, 2014).

A ausência de estruturação populacional entre os ambientes recifais do Nordeste, Sudeste e de ilhas oceânicas da Província Brasileira também foram encontrados para outras espécies de peixes recifais como *Cephalopholis fulva* (Linnaeus, 1758) (FREITAS *et al.*, 2003; SOUZA, 2011; SIMON, 2014), *Acanthurus bahianus* Castelnau, 1855 e *Acanthurus coeruleus* Bloch & Schneider, 1801 (ROCHA *et al.*, 2002) e *Halichoeres penrosei* Starks, 1913 (ROCHA, 2004; ROCHA; ROBERTSON; ROMAN *et al.*, 2005). Contudo, apesar dos casos citados anteriormente, o padrão de ausência de estruturação populacional dentro da Província Brasileira não pode ser tratado como regra geral. A estruturação populacional dentro da província já foi documentada (CUNHA *et al.*, 2014; SIMON, 2014). Além disso, a presença de consideráveis taxas de endemismo nas ilhas oceânicas brasileiras, mesmo nas mais próximas ao continente (Fernando de Noronha e Atol das Rocas) (FLOETER; GASPARINI, 2000), pressupõe, dentre outros fatores, algum nível de restrição ao fluxo gênico.

As diferentes taxas de evolução dos marcadores utilizados (RC e Cit b) complementam as informações evolutivas, proporcionando uma melhor compreensão dos processos filogeográficos em *P. maculatus*. A rede de haplótipos do marcador RC, que evolui mais rapidamente, detectou quatro haplogrupos interconectados (FIGURA 9). Haplótipos compartilhados, inclusive dentro de uma mesma população, foram poucos para esse marcador (70-97% de haplótipos únicos). Entretanto, a presença de haplótipos iguais entre populações diferentes, como observado no presente estudo, sugere eventos de migração muito recentes (LESSIOS; ROBERTSON, 2013).

Também para a RC foram detectados haplótipos mais relacionados com os ambientes insulares (haplogrupo II na FIGURA 9). Foi no haplogrupo II que se ligou o único haplótipo do Caribe incluído nessa pesquisa. Uma maior afinidade entre populações do Caribe e as de ilhas oceânicas brasileiras é um padrão recorrente em peixes recifais (ROCHA; ROBERTSON; ROMAN *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005; LESSIOS; ROBERTSON, 2013). Uma maior similaridade ecológica entre Caribe e ilhas oceânicas brasileiras é apontada como um dos fatores responsáveis por esse padrão (ROCHA, 2003; ROCHA; ROBERTSON; ROMAN *et al.*, 2005). A inclusão de um número maior de haplótipos do Caribe nas análises aqui apresentadas se faz necessário para uma melhor compreensão das relações entre Ilhas oceânica brasileira e Caribe.

A rede de haplótipos do marcador Cit b apresentou uma forma bem diferente da obtida para a RC. A natureza mais conservada do Cit b provavelmente retrata um momento evolutivo diferente do observado pela RC (HELFMAN *et al.*, 2009). Por esse motivo, além de ser utilizado em estudos filogeográficos intraespecíficos (*e.g.* ROCHA *et al.*, 2008; CASTELLANOS-GELL *et al.*, 2012), o Cit b é muito empregado para investigar relações filogenéticas recentes (espécies dentro de um gênero) (*e.g.*

BERNARDI *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2008; BELDADE *et al.*, 2009). A ligação entre os haplótipos de *P. maculatus* do Arquipélago de Fernando de Noronha com a espécie irmã *P. prayensis*, revela um dos possíveis caminhos utilizado por migrantes no momento da dispersão através da Barreira Mesoatlântica (ver discussão anterior sobre o gênero *Pseudupeneus*). Uma rota de dispersão no sentido Atlântico Ocidental-Atlântico Oriental já foi proposta em diferentes estudos, parecendo ser mais comum do que o sentido inverso (JOYEUX *et al.*, 2001; MUSS *et al.*, 2001; FLOETER *et al.*, 2008).

O formato de estrela da rede de haplótipos do Cit b e os valores negativos e significativos do teste de neutralidade ( $F_s$ ) podem indicar uma expansão populacional recente de *P. maculatus* na Província Brasileira. Para os peixes recifais do Atlântico, uma explicação que vem sendo proposta para justificar resultados semelhantes aos aqui apresentados, relaciona os resultados do teste de neutralidade ( $F_s$ ) com extinções locais seguidas por expansões populacionais, provocadas pela redução na disponibilidade de habitats em períodos de máximo glacial (ROCHA; ROBERTSON; ROCHA *et al.*, 2005).

No último período glacial (17 - 19 mil anos atrás), a profundidade oceânica era cerca de 115-130 metros abaixo do nível atual, expondo a maior parte da plataforma continental do norte/nordeste brasileiro, praticamente inviabilizando a formação de comunidades recifais costeiras nessa região, levando assim a extinções locais (ROCHA, 2003; LUDT; ROCHA, 2015). Duas hipóteses, não mutuamente excludentes, podem ser levantadas para explicar a predominância de haplótipos ancestrais na população do Ceará: (1) houve a preservação de linhagens em bancos oceânicos adjacentes à costa cearense durante períodos de extinção ou (2) a costa do Ceará foi um dos primeiros locais a ser colonizado após o término do período glacial por indivíduos provenientes da região caribenha.

A presença de bancos oceânicos ao largo da costa do Ceará, associados à Cadeia Norte-Brasileira e à Cadeia Fernando de Noronha, atualmente entre 50 a 350 metros de profundidade, (COUTINHO, 1996; COELHO-FILHO; FREITAS, 2004; IBGE, 2011) podem explicar a preservação de linhagens ancestrais na costa cearense. A diminuição do nível do mar tornou parte dos bancos oceânicos adjacentes à costa do Ceará ambientes propícios para abrigar comunidades recifais. Dessa forma, esses bancos oceânicos podem então ter atuado como zona de refúgio para muitas espécies de peixes. Posteriormente, com o término gradual do período glacial, os bancos podem ter servido como centros promotores de expansões populacionais, iniciando pela costa do Ceará, devido à proximidade. Esse cenário então explicaria a presença de linhagens ancestrais nessa região. A utilização de bancos e ilhas oceânicas do nordeste (na mesma área da presente pesquisa) durante períodos de máximo glacial também foi proposta por Souza (2011) para explicar os padrões filogeográficos encontrados para a espécie *Cephalopholis fulva*.

A outra hipótese para os resultados encontrados na presente pesquisa é possibilidade da costa cearense ter sido um dos primeiros locais a ser colonizado por indivíduos provenientes da região do Caribe após o término do período glacial. Estes teriam se estabelecido primeiramente no Ceará e, posteriormente, se dispersaram para outros locais. *Pseudupeneus maculatus* parece sofrer menos os efeitos da barreira provocada pelo deságue do rio Amazonas, uma vez que está entre as espécies mais abundantes capturadas em substratos de esponjas abaixo da pluma do Amazonas (COLLETTE; RÜTZLER, 1977), um dos mecanismos propostos para transpor essa barreira (ROCHA, 2003). A inclusão de outras populações de *P. maculatus* em nosso estudo, principalmente do Caribe e do Sul do Brasil, possibilitaria uma melhor avaliação desta hipótese.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mullidae está entre as nove famílias que melhor representam os ambientes recifais. Entretanto, a ausência de dados filogenéticos impossibilitava o uso desse grupo em discussões a respeito dos fatores que moldaram a evolução dos peixes recifais em um contexto global. A filogenia molecular de Mullidae aqui proposta representa, até o momento, o estudo molecular de maior abrangência taxonômica dentro do grupo, incluindo, pela primeira vez, representantes de todos os gêneros reconhecidos. Ao comparar os resultados da filogenia aqui apresentada com uma hipótese filogenética anterior, baseada em caracteres morfológicos, foram recuperados cinco dos seis gêneros propostos.

Hipóteses de relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Pseudupeneus* também foram propostas no presente estudo. Os processos de especiação dentro desse gênero se mostraram fortemente influenciados pela presença de barreiras biogeográficas (Barreira Mesoatlântica e Istmo do Panamá), envolvendo processos de vicariância e dispersão.

Os resultados da presente pesquisa indicam fluxo gênico irrestrito entre populações de *P. maculatus* das áreas estudadas dentro da Província Brasileira. Como ressaltado por Bowen *et al.* (2014), dados de uma única espécie podem não representar tendências filogeográficas gerais de um grupo tão diverso como os peixes recifais, mas podem contribuir para uma futura filogeografia comparativa. Portanto, o presente estudo contribui com informações filogenéticas e filogeográficas importantes para um maior conhecimento de padrões tanto locais quanto globais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA-CAMPBELL, Y.; FLOETER, S. R.; ROBERTSON, D. R.; BELLWOOD, D. R.; BERNARDI, G. Molecular phylogenetics and evolution of *Holacanthus angelfishes* (Pomacanthidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 1, p. 456–461, 2010.

APOSTOLIDIS, A. P.; MAMURIS, Z.; TRIANTAPHYLLIDIS, C. Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes. **Biochemical systematics and ecology**, v. 29, n. 9, p. 901–909, 2001.

ASGHARIAN, H.; SAHAFI, H. H.; ARDALAN, A. A.; SHEKARRIZ, S.; ELAHI, E. Cytochrome c oxidase subunit 1 barcode data of fish of the Nayband National Park in the Persian Gulf and analysis using meta-data flag several cryptic species. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 3, p. 461–72, 2011.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge-EUA: Harvard University Press, 2000.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd ed. USA: Sinauer Associates, 2004.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3–15, 2009.

AZZOUZ, K.; DIATTA, Y.; MANSOUR, S.; BOUMAÏZA, M.; BEN AMOR, M. M.; CAPAPÉ, C. First record of the west African goatfish, *Pseudupeneus prayensis* (Actinopterygii: Perciformes: Mullidae), off the Tunisian coast (central Mediterranean). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 41, n. 2, p. 133–136, 2011.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BELDADE, R.; HEISER, J. B.; ROBERTSON, D. R.; GASPARINI, J. L.; FLOETER, S. R.; BERNARDI, G. Historical biogeography and speciation in the Creole wrasses (Labridae, Clepticus). **Marine Biology**, v. 156, n. 4, p. 679–687, 2009.

BELLWOOD, D. R. What are reef fishes? Comment on the report by D.R. Robertson: Do coral-reef fish faunas have a distinctive taxonomic structure? (Coral Reefs 17 : 179–186). **Coral Reefs**, v. 17, n. 2, p. 187–189, 1998.

BELLWOOD, D. R.; KLANTEN, S.; COWMAN, P. F.; PRATCHETT, M. S.; KONOW, N.; VAN HERWERDEN, L. Evolutionary history of the butterflyfishes (f: Chaetodontidae) and the rise of coral feeding fishes. **Journal of evolutionary biology**, v. 23, n. 2, p. 335–349, 2010.

BEN-TUVIA, A. Mullidae. In: FISCHER W.; BIANCHI G.; SCOTT W.B. (eds.) **FAO species identification sheets for fishery purposes. Central eastern Atlantic Fishing area 34, 47 (in part). Vol. III. Bony Fishes, Malacanthidae to Scombridae.** FAO ed., p.332, 1981. Roma.

BEN-TUVIA, A.; GOLANI, D. A new species of Goatfish (Mullidae) of the genus *Upeneus* from the Red Sea and the eastern Mediterranean. **Israel Journal of Zoology**, v. 36, n. July, p. 103–112, 1989.

BERMINGHAM, E.; MCCAFFERTY, S. S.; MARTIN, A. P. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: T. D. Koche; C. A. Stepien (Eds.); **Molecular systematics of fishes.** p.113–128, 1997. New York - USA: Academic Press.

BERNARDI, G.; ALVA-CAMPBELL, Y. R.; GASPARINI, J. L.; FLOETER, S. R. Molecular ecology, speciation, and evolution of the reef fish genus *Anisotremus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 3, p. 929–935, 2008.

BETANCUR-R, R.; BROUGHTON, R. E.; WILEY, E. O.; CARPENTER, K.; LÓPEZ, J. A.; LI, C.; HOLCROFT, N. I.; ARCILA, D.; SANCIANGCO, M.; II, J. C. C.; ZHANG, F.; CAMPBELL, M. A.; BALLESTEROS, J. A.; ROA-VARON, A.; WILLIS, S.; BORDEN, W. C.; HOUGH, D. J.; LU, G. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **PLOS Currents Tree of Life**, v. 0732988, p. 1–45, 2013.

BOS, A. R. *Upeneus nigromarginatus*, a new species of goatfish (Perciformes: Mullidae) from the Philippines. **Raffles Bulletin of Zoology**, v. 62, p. 750–758, 2014.

BOWEN, B. W.; BASS, A. L.; ROCHA, L. A.; GRANT, W. S.; ROBERTSON, D. R. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): Ring species complex on a global scale. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 1029–1039, 2001.

BOWEN, B. W.; SHANKER, K.; YASUDA, N.; CELIA, M.; MALAY, M. C. M. D.; HEYDEN, S. V.; PAULAY, G.; ROCHA, L. A.; SELKOE, K. A.; BARBER, P. H.; WILLIAMS, S. T.; LESSIOS, H. A.; CRANDALL, E. D.; BERNARDI, G.; MEYER, C. P.; CARPENTER, K. E.; TOONEN, R. J. Phylogeography unplugged: comparative surveys in the genomic era. **Bulletin of Marine Science**, v. 90, n. 1, p. 13–46, 2014.

BOWEN, D. W.; ROCHA, L. A.; TOONEN, R. J.; KARL, S. A. The origins of tropical marine biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 6, p. 359–366, 2013.

BRALEY, M.; GOLDSWORTHY, S. D.; PAGE, B.; STEER, M.; AUSTIN, J. J. Assessing morphological and DNA-based diet analysis techniques in a generalist predator, the arrow squid *Nototodarus gouldi*. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 3, p. 466–474, 2010.

BRIGGS, J. C. **Marine Zoogeography.** USA: McGraw-Hill book Company, 1974.

BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. *Biogeografia.* , 2006. São Paulo: FUNPEC.

CALDWELL, M. C. Development and distribution of larval and juvenile fishes of the family Mullidae of the western North Atlantic. **Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service**, v. 62, p. 403–457, 1962.

CASTELLANOS-GELL, J.; ROBAINAS-BARCIA, A.; CASANE, D.; CHEVALIER-MONTEAGUDO, P.; PINA-AMARGOS, F.; GARCIA-MACHADO, E. The surgeonfish, *Acanthurus bahianus*, has crossed the Amazon-Orinoco outflow barrier. **Marine Biology**, v. 159, n. 7, p. 1561–1565, 2012.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. 2nd ed. Caracas: Fundación científica Los Roques, 1993.

CHENG, Y.; SHI, G.; XU, T.; LI, H.; SUN, Y.; WANG, R. Complete mitochondrial genome of the red drum, *Sciaenops ocellatus* (Perciformes, Sciaenidae): absence of the typical conserved motif in the origin of the light-strand replication. **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 2, p. 126–128, 2012. Informa Healthcare London.

CHENG, Y.; WANG, R.; SUN, Y.; XU, T. The complete mitochondrial genome of the small yellow croaker and partitioned Bayesian analysis of Sciaenidae fish phylogeny. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 191–199, 2012.

CHOW, S.; HAZAMA, K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1255–1256, 1998.

COELHO-FILHO, P. A.; FREITAS, T. C. A. Macrozoobentos da plataforma continental externa e bancos oceânicos do nordeste do Brasil durante a primavera de 2000 pelo Programa REVIZEE (Comissão NE IV). **Tropical Oceanography**, v. 32, n. 2, p. 201–218, 2004.

COLLETTE, B. B.; RÜTZLER, K. Reef fishes over sponge bottoms off the mouth of the Amazon River. Third International Coral Reef Symposium. **Anais do Third International Coral Reef Symposium**. p.305–310, 1977. Miami: University of Miami - Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science.

COSTA, F. O.; LANDI, M.; MARTINS, R.; COSTA, M. H.; COSTA, M. E.; CARNEIRO, M.; ALVES, M. J.; STEINKE, D.; CARVALHO, G. R. A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from Portugal. **PLoS one**, v. 7, n. 4, p. e35858, 2012.

COUTINHO, P. N. **Levantamento do Estado da Arte da Pesquisa dos Recursos Vivos Marinhos do Brasil - Programa REVIZEE - Oceanografia Geológica (Costa Nordeste)**. FEMAR/SECIRM, 1996.

CUI, Z.; LIU, Y.; LI, C. P.; YOU, F.; CHU, K. H. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. **Gene**, v. 432, n. 1-2, p. 33–43, 2009.

CUNHA, F. E. A.; CARVALHO, R. A. A.; ARAÚJO, M. E. Exportation of reef fish for human consumption: long-term analysis using data from Rio Grande do Norte, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 4, p. 369–378, 2012.

CUNHA, I.; SOUZA, A.; DIAS, E. Genetic multipartitions based on D-loop sequences and chromosomal patterns in Brown chromis, *Chromis multilineata* (Pomacentridae), in the Western Atlantic. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DEAGLE, B. E.; KIRKWOOD, R.; JARMAN, S. N. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. **Molecular ecology**, v. 18, n. 9, p. 2022–2038, 2009.

DIBATTISTA, J. D.; ROCHA, L. A.; CRAIG, M. T.; FELDHEIM, K. A.; BOWEN, B. W. Phylogeography of two closely related Indo-Pacific butterflyfishes reveals divergent evolutionary histories and discordant results from mtDNA and microsatellites. **The Journal of heredity**, v. 103, n. 5, p. 617–629, 2012.

DOHERTY, P. J.; PLANES, S.; MATHER, P. Gene flow and larval duration in 7 species of fish from the Great-Barrier-Reef. **Ecology**, v. 76, n. 8, p. 2373–2391, 1995.

ESCHMEYER, W. N. Catalog of Fishes (On-Line). Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatsearch.html>>.

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; FONG, J. D.; POLACK, D. A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, n. 2525, p. 19–50, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data Laurent. **Genetics**, v. 491, p. 479–491, 1992.

FEITOZA, B. M.; ROSA, R. S.; ROCHA, L. A. Ecology and zoogeography of deepreef fishes in northeastern Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v. 76, n. 3, p. 725–742, 2005.

FERREIRA, C. E. L.; FLOETER, S. R.; GASPARINI, J. L.; FERREIRA, B. P.; JOYEUX, J. C. Trophic structure patterns of Brazilian reef fishes: a latitudinal comparison. **Journal of Biogeography**, v. 31, n. 7, p. 1093–1106, 2004.

FLOETER, S. R.; GASPARINI, J. L. The southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. **Journal of Fish Biology**, v. 56, n. 5, p. 1099–1114, 2000.

- FLOETER, S. R.; GUIMARAES, R. Z. P.; ROCHA, L. A.; FERREIRA, C. E. L.; RANGEL, C. A.; GASPARINI, J. L. Geographic variation in reef-fish assemblages along the Brazilian coast. **Global Ecology and Biogeography**, v. 10, n. 4, p. 423–431, 2001.
- FLOETER, S. R.; ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; JOYEUX, J. C.; SMITH-VANIZ, W. F.; WIRTZ, P.; EDWARDS, A. J.; BARREIROS, J. P.; FERREIRA, C. E. L.; GASPARINI, J. L.; BRITO, A.; FALCON, J. M.; BOWEN, B. W.; BERNARDI, G. Atlantic reef fish biogeography and evolution. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 1, p. 22–47, 2008.
- FRANCINI-FILHO, R. B.; MOURA, R. L.; SAZIMA, I. Cleaning by the wrasse *Thalassoma noronhanum*, with two records of predation by its grouper client *Cephalopholis fulva*. **Journal of Fish Biology**, v. 56, n. 4, p. 802–809, 2000.
- FREITAS, J. E. P.; ARAÚJO, M. E.; SOLÉ-CAVA, A. M. Estruturação genética das populações de duas espécies de peixes recifais do Atol das Rocas e da costa do Ceará. **Tropical Oceanography**, v. 31, n. 2, p. 193–201, 2003.
- FREITAS, J. E. P.; LOTUFO, T. M. C. Reef fish assemblage and zoogeographic affinities of a scarcely known region of the western equatorial Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, p. 1–11, 2014.
- FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. .
- FU, Y. X. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 557–570, 1996.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.
- GADAGKAR, S. R.; ROSENBERG, M. S.; KUMAR, S. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. **Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 304, n. 1, p. 64–74, 2005.
- GOLANI, D.; RITTE, U. Genetic relationship in goatfishes (Mullidae: Perciformes) of the Red Sea and the Mediterranean, with remarks on Suez Canal migrants. **Scientia Marina**, v. 63, n. 2, p. 129–135, 1999.
- GOSLINE, W. A. Structure, function, and ecology in the goatfishes (family Mullidae). **Pacific Science**, v. 38, n. 4, p. 312–323, 1984.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307–21, 2010.

- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.
- HALL, B. K.; WAKE, M. H. Introduction: Larval Development, Evolution, and Ecology. In: HALL, B. K.; WAKE, M. H. (Eds.); **The origin and evolution of larval forms**. 1st ed., v. 1, p.1–19, 1999. USA: Academic Press.
- HARRISON, R. G. The language of speciation. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 66, n. 12, p. 3643–57, 2012.
- HAVIRD, J. C.; SANTOS, S. R. Performance of single and concatenated sets of mitochondrial genes at inferring metazoan relationships relative to full mitogenome data. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e84080, 2014.
- HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E.; BOWEN, B. W. **The diversity of fishes**. 2nd ed. UK: Wiley-Blackwell, 2009.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 291–301, 2010.
- HONÓRIO, P. P. F.; RAMOS, R. T. C.; FEITOZA, B. M. Composition and structure of reef fish communities in Paraíba State, north-eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 77, n. 4, p. 907–926, 2010.
- HUBERT, N.; MEYER, C. P.; BRUGGEMANN, H. J.; GUÉRIN, F.; KOMENO, R. J. L.; ESPIAU, B.; CAUSSE, R.; WILLIAMS, J. T.; PLANES, S. Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e28987, 2012.
- HURTADO, L. A.; LEE, E. J.; MATEOS, M.; TAITI, S. Global diversification at the harsh sea-land interface: mitochondrial phylogeny of the supralittoral isopod genus *Tylos* (Tyliidae, Oniscidea). **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94081, 2014.
- IBGE. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2011.
- IVANOVA, N. V; ZEMLAKE, T. S.; HANNER, R. H.; HEBERT, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 544–548, 2007.
- JORDAN, D. S. The Law of Geminate Species. **The American Naturalist**, v. 44, n. 494, p. 73–80, 1908.

JOYEUX, J. C.; FLOETER, S. R.; FERREIRA, C. E. L.; GASPARINI, J. L. Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 7, p. 831–841, 2001.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–80, 2013.

KESKIN, E.; ATAR, H. H. DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 5, p. 788–797, 2013.

KESKIN, E.; CAN, A. Phylogenetic relationships among four species and a sub-species of Mullidae (Actinopterygii; Perciformes) based on mitochondrial cytochrome B, 12S rRNA and cytochrome oxidase II genes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 5, p. 653–661, 2009.

KIM, B. J. Comparative Anatomy and Phylogeny of the Family Mullidae (Teleostei: Perciformes). **Memoirs of the Graduate School of Fisheries Sciences**, v. 49, n. 1, 2002.

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 265, n. 1412, p. 2257–2263, 1998.

KÜHLMORGEN-HILLE, G. Mullidae. In: W. FISCHER; WHITEHEAD, P. J. P. (Eds.); **FAO species identification sheets for fish-ery purpose. Eastern Indian Ocean (fishing area 57) and Western Central Pacific (fishing area 71)**, 1974. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

LAKRA, W. S.; VERMA, M. S.; GOSWAMI, M.; Lal, K. K.; MOHINDRA, V.; PUNIA, P.; GOPALAKRISHNAN, A.; SINGH, K. V.; WARD, R. D.; HEBERT, P. DNA barcoding Indian marine fishes. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 60–71, 2011.

LEE, W. J.; CONROY, J.; HOWELL, W. H.; KOCHER, T. D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of molecular evolution**, v. 41, n. 1, p. 54–66, 1995.

LEIS, J. M. The pelagic stage of reef fishes: the larval biology of coral reef fishes,. In: SALE P. F. (Ed.); **The Ecology of Fishes on Coral Reefs**. p.183–227, 1991. EUA - San Diego: Academic Press.

LESSIOS, H. A. The Great American Schism: Divergence of Marine Organisms After the Rise of the Central American Isthmus. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 39, p. 63–91, 2008.

- LESSIOS, H. A.; ROBERTSON, D. R. Speciation on a round planet: phylogeography of the goatfish genus *Mulloidichthys*. (L. Rocha, Ed.) **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 12, p. 2373–2384, 2013.
- LIANG, R.; ZHENG, W.; ZOU, Q.; ZENG, Y.; ZHU, S.; ZOU, J. The complete mitochondrial genome of black grunt *Hapalogenys nigripinnis*. **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 6, p. 444–6, 2012.
- LIMA, D.; FREITAS, J. E. P.; ARAÚJO, M. E.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 320, n. 2, p. 211–223, 2005.
- LUDT, W. B.; ROCHA, L. A. Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. **Journal of Biogeography**, v. 42, p. 25–38, 2015.
- LUIZ, O. J.; MADIN, J. S.; ROBERTSON, D. R.; ROCHA, L. A.; WIRTZ, P.; FLOETER, S. R. Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 279, n. 1730, p. 1033–1040, 2012.
- LUO, A.; QIAO, H.; ZHANG, Y.; SHI, W.; HO, S. Y. W.; XU, W.; ZHANG, A. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 10, n. 242, p. 1–13, 2010.
- MATIAS, A. M. A.; ANTICAMARA, J. A.; QUILANG, J. P. High gene flow in reef fishes and its implications for ad-hoc no-take marine reserves. **Mitochondrial DNA**, v. 24, n. 5, p. 584–595, 2013.
- MAYR, E. **O que é a evolução**. Brasil: Rocco, 2009.
- MCCORMICK, M. I. Development and changes at settlement in the barbel structure of the reef fish, *Upeneus tragula* (Mullidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 37, n. 3, p. 269–282, 1993.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Teleostei 4**. São Paulo: Museu de Zoologia - USP, 1985.
- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: HOCHANCKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. v. 2, p.484, 1993. New York - USA: Elsevier.
- MOURA, R. L.; FIGUEIREDO, J. L.; SAZIMA, I. A new parrotfish (Scaridae) from Brazil, and revalidation of *Sparisoma amplum* (Ranzani, 1842), *Sparisoma frondosum* (Agassiz, 1831), *Sparisoma axillare* (Steindachner, 1878) and *Scarus trispinosus* Valenciennes, 1840. **Bulletin of Marine Science**, v. 68, n. 3, p. 505–524, 2001.

MUSS, A.; ROBERTSON, D. R.; STEPIEN, C. A.; WIRTZ, P.; BOWEN, B. W. Phylogeography of *Ophioblennius*: The role of ocean currents and geography in reef fish evolution. **Evolution**, v. 55, n. 3, p. 561–572, 2001.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York - USA: Columbia University Press, 1987.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

PALUMBI, S. R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, p. 547–572, 1994.

PALUMBI, S. R. Nucleic Acids II: The Polymerised Chain Reaction. In: HILLIS D. M.; MORITZ, C.; MABLE B. K. (Eds.). **Molecular Systematics**. p.655, 1996. Massachusetts - EUA: Sinauer Associates Inc.

PELLISSIER, L.; LEPRIEUR, F.; PARRAVICINI, V.; COWMAN, P. F.; KULBICKI, M.; LITSIOS, G.; OLSEN, S. M.; WISZ, M. S.; BELLWOOD, D. R.; MOUILLOT, D. Quaternary coral reef refugia preserved fish diversity. **Science**, v. 344, n. 6187, p. 1016–9, 2014.

POLZIN, T.; DANESHMAND, S. V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**, v. 31, n. 1, p. 12–20, 2003.

PRICE, S. A.; SCHMITZ, L. Two waves of colonization straddling the K–Pg boundary formed the modern reef fish fauna. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 281, n. 20140321, p. 1–8, 2014.

RANDALL, J. E.; HEEMSTRA, E. Three new goatfishes of the genus *Parupeneus* from the Western Indian Ocean, with resurrection of *P. seychellensis*. **Smithiana Bulletin**, v. 10, p. 37–50, 2009.

RANDALL, J. E.; KING, D. R. *Parupeneus fraserorum*, a new species of goatfish (Perciformes: Mullidae) from South Africa and Madagascar. **Smithiana Bulletin**, v. 10, p. 31–33, 2009.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3rd ed. Porto Alegre: Artemed, 2006.

ROCHA, L. A. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. **Journal of Biogeography**, v. 30, n. 8, p. 1161–1171, 2003.

ROCHA, L. A. Mitochondrial DNA and color pattern variation in three western Atlantic *Halichoeres* (labridae), with the revalidation of two species. **Copeia**, , n. 4, p. 770–782, 2004.

ROCHA, L. A.; BASS, A. L.; ROBERTSON, D. R.; BOWEN, B. W. Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic

surgeonfishes (Teleostei : Acanthuridae). **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 243–252, 2002.

ROCHA, L. A.; LINDEMAN, K. C.; ROCHA, C. R.; LESSIOS, H. A. Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 48, n. 3, p. 918–28, 2008.

ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; ROCHA, C. R.; VAN TASSELL, J. L.; CRAIG, M. T.; BOWEN, B. W. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. **Molecular ecology**, v. 14, n. 13, p. 3921–3928, 2005.

ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; ROMAN, J.; BOWEN, B. W. Ecological speciation in tropical reef fishes. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 272, n. 1563, p. 573–579, 2005.

ROCHA, L. A.; ROCHA, C. R.; ROBERTSON, D. R.; BOWEN, B. W. Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 8, p. 16, 2008.

ROCHA, L. A.; ROSA, I. L. New species of *Haemulon* (Teleostei : Haemulidae) from the northeastern Brazilian coast. **Copeia**, , n. 2, p. 447–452, 1999.

ROCHA, L. A.; ROSA, I. L. Baseline assessment of reef fish assemblages of Parcel Manuel Luiz Marine State Park, Maranhao, north-east Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 4, p. 985–998, 2001.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. V.; Ayres, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539–42, 2012.

RUSSO, C. A. M.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. (Eds.); **Biologia molecular e evolução**. 2nd ed., p.157–164, 2012. Ribeirão Preto-BR: Holos Editora.

RUSSO, C. A.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 3, p. 525–536, 1996.

SALE, P. F. **The ecology of fishes on coral reefs**. California: Academic Press, 1991.

SANTANA, F. M.; MORIZE, E.; LESSA, R. Age and growth of the spotted goatfish, *Pseudupeneus maculatus* (Bloch, 1793) in Brazil, validated through marginal increment and oxytetracycline dyes in the sagittae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 2, p. 132–137, 2006.

SAZIMA, I.; GASPARINI, J. L.; MOURRA, R. L. *Gramma brasiliensis*, a new basslet from the western South Atlantic (Perciformes: Grammatidae). **Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v. 3, n. 1, p. 39–43, 1998.

SAZIMA, I.; SAZIMA, C.; FRANCINI, R. B.; MOURA, R. L. Daily cleaning activity and diversity of clients of the barber goby, *Elacatinus figaro*, on rocky reefs in southeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 59, n. 1, p. 69–77, 2000.

SCHNEIDER, W. **FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine resources of the Gulf of Guinea. Prepared and published with the support of the FAO Regional Office for Africa.** Roma: FAO, 1990.

SIMON, T. E. **Montes submarinos da Cadeia Vitória-Trindade como alpondras para peixes recifais**, 2014. Universidade Federal do Espírito Santo.

SONG, C. B.; NEAR, T. J.; PAGE, L. M. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b DNA sequence data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 10, n. 3, p. 343–53, 1998.

SONG, H. Y.; MABUCHI, K.; SATOH, T. P.; MOORE, J. A.; YAMANOUE, Y.; MIYA, M.; NISHIDA, M. Mitogenomic circumscription of a novel percomorph fish clade mainly comprising “Syngnathoidei” (Teleostei). **Gene**, v. 542, n. 2, p. 146–55, 2014.

SOUZA, A. S. **Análise da estrutura genética populacional da piraúna (Cephalopholis fulva: Serranidae) ao longo da costa e ilhas oceânicas brasileiras**, 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

STEINKE, D.; ZEMLAK, T. S.; HEBERT, P. D. N. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6300, 2009.

SZABÓ, Z.; SNELGROVE, B.; CRAIG, M. T.; ROCHA, L. A.; BOWEN, B. W. Phylogeography of the manybar goatfish, *Parupeneus multifasciatus*, reveals isolation of the Hawaiian Archipelago and a cryptic species in the Marquesas Islands. **Bulletin of Marine Science**, v. 90, n. 1, p. 493–512, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, 2013.

TAVERA, J. J.; ACERO P, A.; BALART, E. F.; BERNARDI, G. Molecular phylogeny of grunts (Teleostei, Haemulidae), with an emphasis on the ecology, evolution, and speciation history of new world species. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 57, p. 1–16, 2012.

- TESKE, P. R.; CHERRY, M. I.; MATTHEE, C. A. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 2, p. 273–286, 2004.
- UIBLEIN, F. Goatfishes (Mullidae) as indicators in tropical and temperate coastal habitat monitoring and management. **Marine Biology Research**, v. 3, n. 5, p. 275–288, 2007.
- UIBLEIN, F.; HEEMSTRA, P. C. A taxonomic review of the Western Indian Ocean goatfishes of the genus *Upeneus* (Family Mullidae), with descriptions of four new species. **Smithiana Bulletin**, v. 11, p. 35–71, 2010.
- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1419–1439, 2006.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 11, n. 1462, p. 1847–1857, 2005.
- WEERSING, K.; TOONEN, R. J. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. **Marine Ecology Progress Series**, v. 393, p. 1–12, 2009.
- WHITLEY, G. P. Ichthyological notes and illustrations. **Australian Zoologist**, v. 10, p. 1–51, 1941.
- XIA, X. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720–1728, 2013.
- XIA, X.; LEMEY, P. Assessing substitution saturation with DAMBE. In: P. Lemey; M. Salemi; A. M. Vandamme (Eds.); **The phylogenetic handbook - A practical Approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. 2nd ed., p.615–630, 2009. Cambridge-EUA: Cambridge University Press.
- XIA, X.; XIE, Z.; SALEMI, M.; CHEN, L.; WANG, Y. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 26, n. 1, p. 1–7, 2003.
- XU, T. J.; CHENG, Y. Z.; SUN, Y. N.; SHI, G.; WANG, R. X. The complete mitochondrial genome of bighead croaker, *Collichthys niveatus* (Perciformes, Sciaenidae): structure of control region and phylogenetic considerations. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 7, p. 4673–85, 2011.
- YANG, Z. H. **Computational molecular evolution**. New York - USA: Oxford University Press, 2006.

ZHANG, J. B.; HANNER, R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 1, p. 31–42, 2011.

ZHANG, Z.; ZHAO, L.; SONG, N.; GAO, T. The complete mitochondrial genome of *Johnius grypotus* (Perciformes: Sciaenidae). **Mitochondrial DNA**, v. 24, n. 5, p. 504–6, 2013.

## 8 APÊNDICES

### 8.1 Apêndice – A

Tabela - Resultados obtidos para o teste de Xia *et al.* (2003) mostrando que os valores do índice de saturação de substituição (ISS) foram significativamente menores que os valores críticos desse índice para saturação (Iss.c) nos diferentes conjuntos de dados.

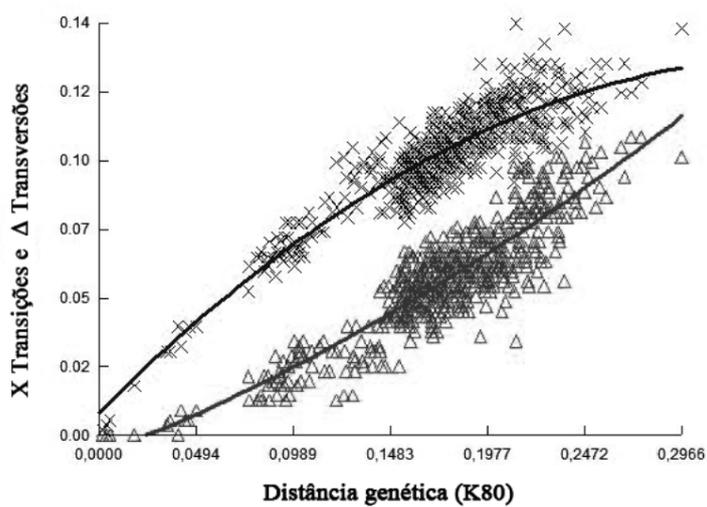
Conjuntos de dados	COI	Iss < Iss.c		
		16S	Cit b	IS7
Família abrangente COI 35 espécies)	0,247 < 0,710	-	-	-
Família abrangente 16S 15 espécies)	-	0,250 < 0,706	-	-
Gênero <i>Pseudupeneus</i>	0,418 < 0,785	0,268 < 0,780	0,459 < 0,786	0,320 < 0,774

- representa conjunto de dados não disponíveis

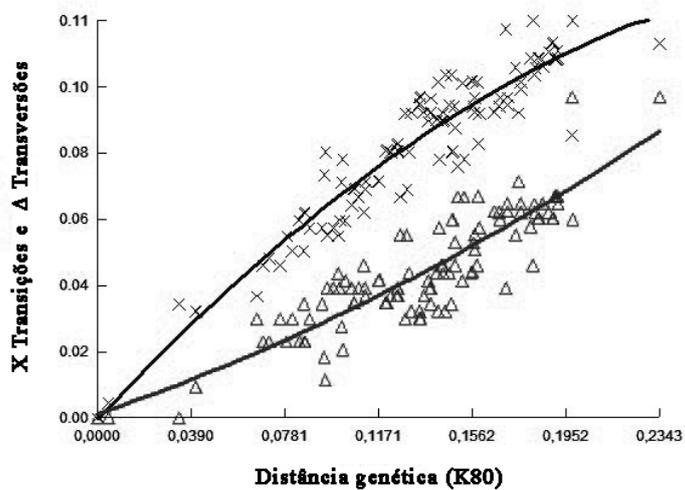
## 8.2 Apêndice - B

Os Gráficos (1 a 6) avaliaram a existência de possíveis saturações nas substituições de nucleotídeos para os diferentes marcadores e diferentes conjuntos de dados. Os gráficos apresentam a relação entre o número de transições e transversões versus distâncias genéticas (K80).

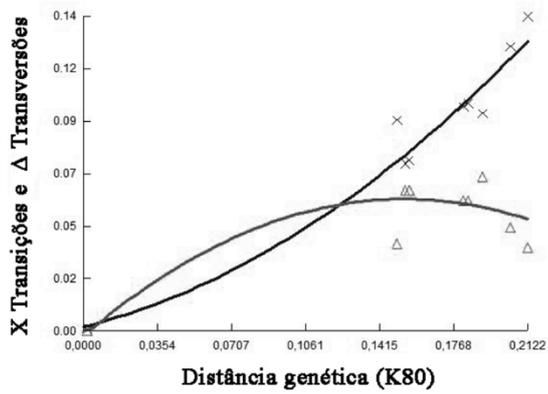
1 - COI (35 espécies, 573 pares de base)



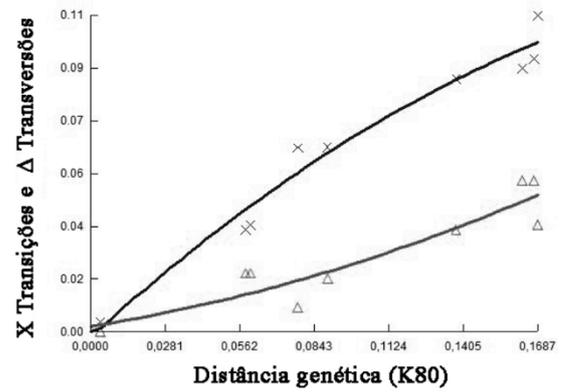
2 - 16S (15 espécies, 467 pares de base)



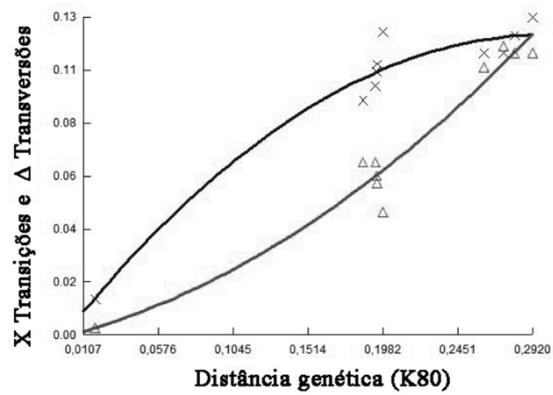
3 - COI (5 espécies, 666 pares de base)



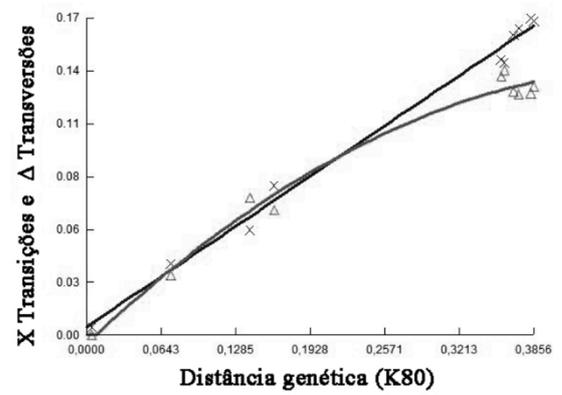
4 - 16S (5 espécies, 594 pares de base)



5 - Cit b (5 espécies, 693 pares de base)

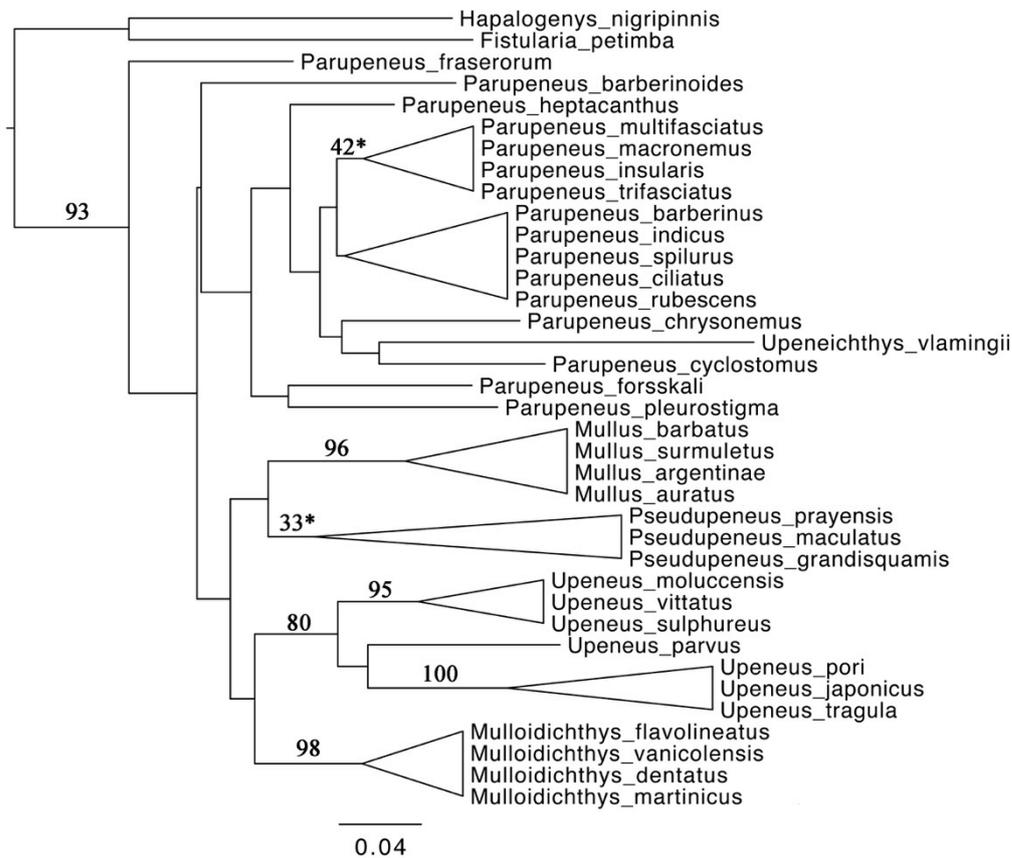


6 - IS7 (5 espécies, 498 pares de base)

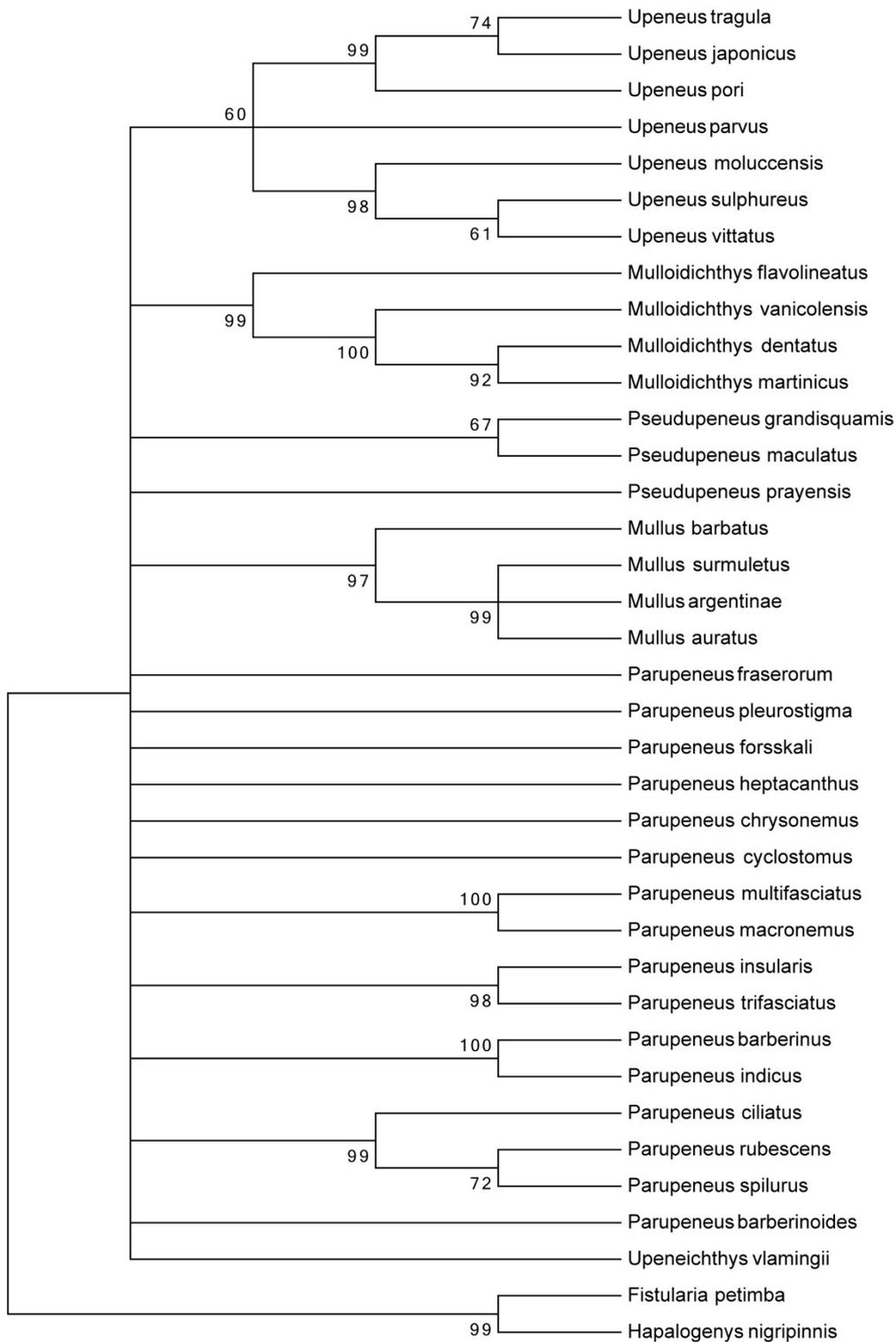


### 8.3 Apêndice – C

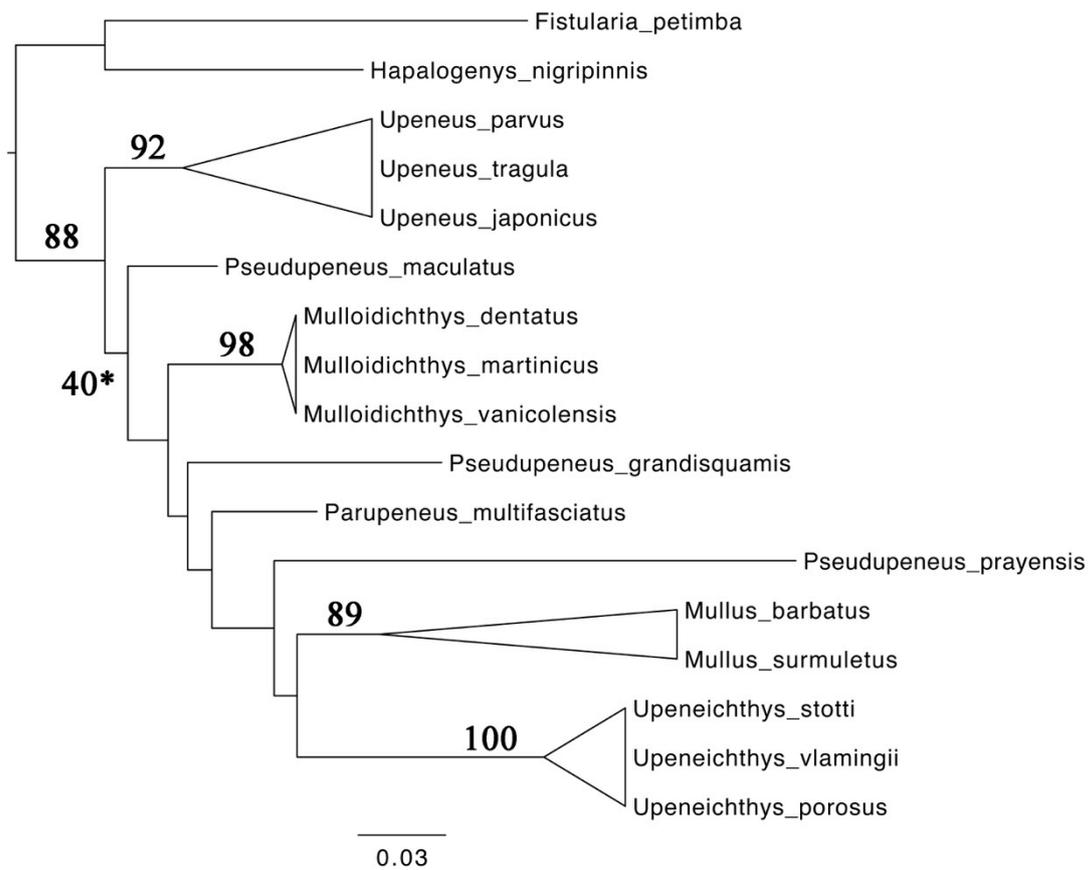
As árvores (1 a 6) representam as relações filogenéticas obtidas para os diferentes conjuntos de dados utilizando os métodos Máxima Verossimilhança (ML) e Máxima Parcimônia (MP).



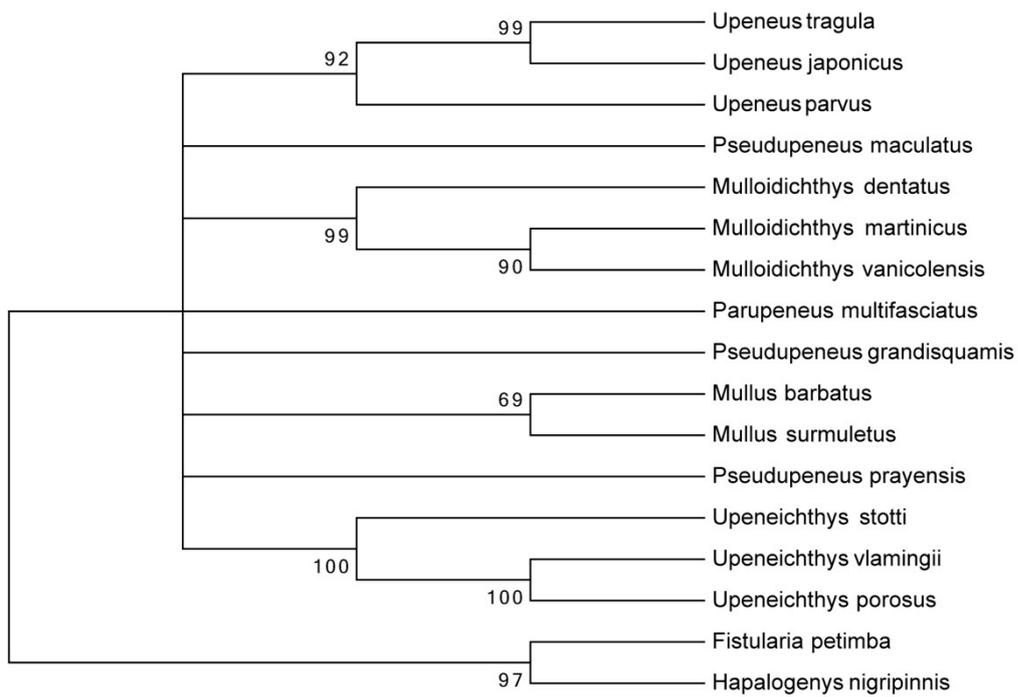
1 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador COI, utilizando Máxima Verossimilhança (ML). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 70%,\* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia da árvore bayesiana.



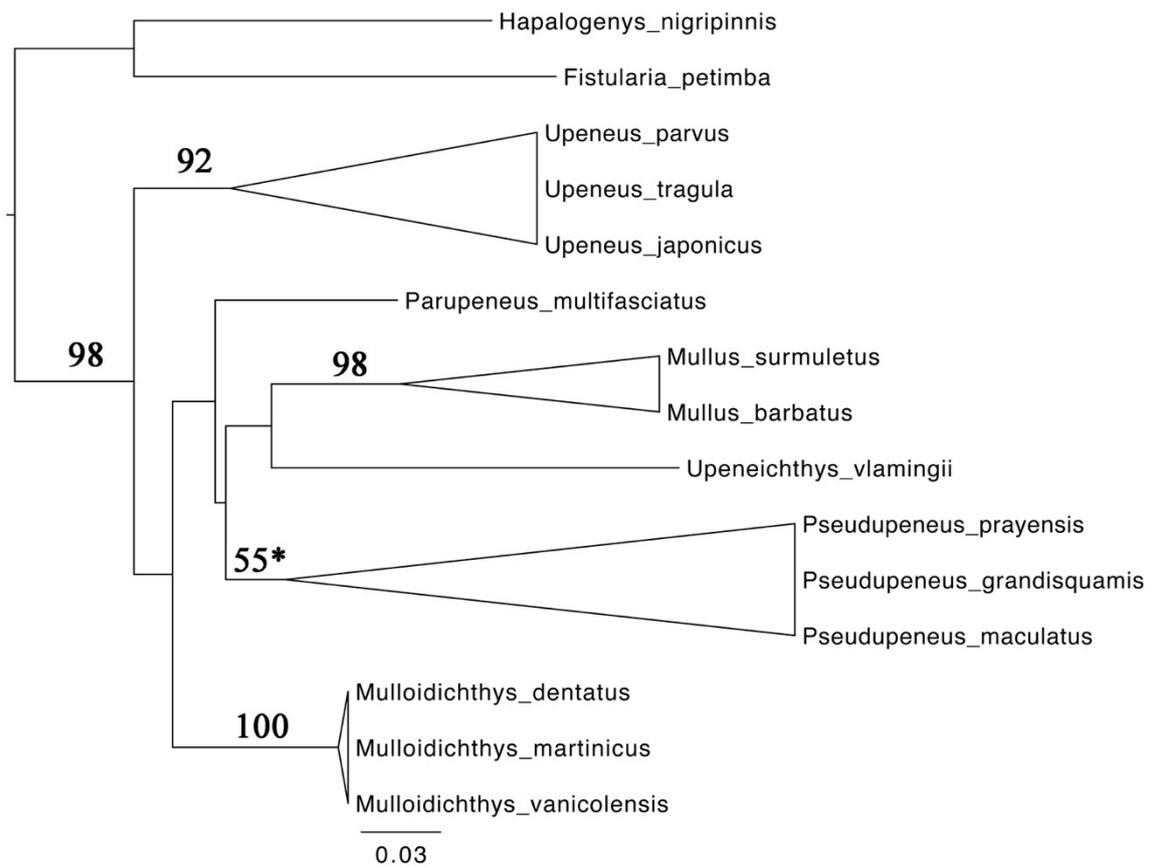
2 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador COI, utilizando Máxima Parcimônia (MP). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 60.



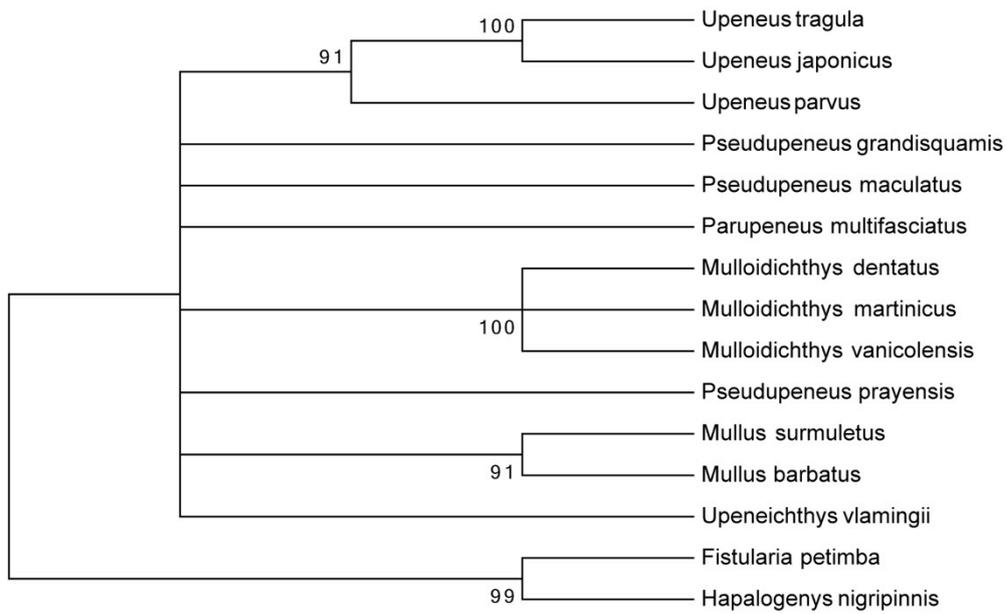
3 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador 16S, utilizando Máxima Verossimilhança (ML). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 70%,\* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia da árvore bayesiana.



4 - Árvore filogenética da família Mullidae para o marcador 16S, utilizando Máxima Parcimônia (MP). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 60.



5 - Árvore filogenética da família Mullidae para os marcadores COI e 16S concatenados, utilizando Máxima Verossimilhança (ML). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 70%,\* representa valores suportes menores do que os limites escolhidos, contudo mantendo a mesma topologia da árvore bayesiana.



6 - Árvore filogenética da família Mullidae para os marcadores COI e 16S concatenados, utilizando Máxima Parcimônia (MP). Estão representados os valores suporte (*bootstrap*) maiores que 60.