

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA - PPGOB

DIVERSIDADE GENÉTICA
E ESTRUTURA POPULACIONAL
DA CASTANHA (*Umbrina canosai*, Sciaenidae)
NO ATLÂNTICO SUDOESTE,
INFERIDA POR MICROSSATÉLITES

DAVI DE VASCONCELLOS MACHADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Haimovici

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maíra Proietti

RIO GRANDE

Março/2021

Ficha Catalográfica

M149d Machado, Davi de Vasconcellos.

Diversidade genética e estrutura populacional da castanha (*Umbrina canosai*, *Sciaenidae*) no Atlântico Sudoeste, inferida por Microssatélites / Davi de Vasconcellos Machado. – 2021. 98 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Manuel Haimovici.

Coorientadora: Dra. Maíra Proietti.

1. Conectividade Genética 2. Migração 3. Peixe Marinho 4. Efeito Gargalo 5. Ecologia Molecular I. Haimovici, Manuel II. Proietti, Maíra III. Título.

CDU 567(261)

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**



ATA 03/2021 - DEFESA DE DISSERTAÇÃO - Oc. Davi de Vasconcellos Machado

Às quatorze horas do dia trinta e um de março do ano de dois mil e vinte e um, na Sala virtual: <https://us02web.zoom.us/j/6861478993> reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação do Oc. Davi de Vasconcellos Machado, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Manuel Haimovici (Orientador) - Instituto de Oceanografia - FURG; Profa. Dra. Maira Carneiro Proietti - Co-Orientadora, Instituto de Oceanografia - FURG; Prof. Dr. Luis Gustavo Cardoso - Instituto de Oceanografia - FURG; Dra. Sarah de Souza Alves Teodoro (membro externo). Título da Dissertação: "Diversidade genética e estrutura populacional da castanha (Umbrina canosai, Sciaenidae) no Atlântico Sudoeste, inferida por microssatélites". Dando início à reunião, o Coordenador Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica – Prof. Dr. Luis Gustavo Cardoso - agradeceu a presença de todos e fez a apresentação da Comissão Examinadora. Logo após, explicou que o candidato teria um tempo de 45 a 60 min. para explanação do tema, e cada membro da Comissão, um máximo de 30 min. para perguntas. Dando prosseguimento, passou a palavra ao candidato que apresentou o tema e respondeu às perguntas formuladas. Após explanação, a Comissão aprovou o que segue: As sugestões de todos os membros da Comissão Examinadora, que seguem em pareceres em anexo, foram aceitas pelo orientador/candidato para incorporação na versão final. Foi atribuída a seguinte classificação ao candidato: Profa. Dra. Maira Carneiro Proietti - Classificação: Aprovado; Prof. Dr. Luis Gustavo Cardoso - Classificação: Aprovado; Dra. Sarah de Souza Alves Teodoro - Classificação: Aprovado. O candidato foi considerado APROVADO por UNANIMIDADE. Nada mais havendo a tratar, lavro a presente ata que após lida e Aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora, pelo aluno e pelo Coordenador Adjunto do PPGOB.

Prof. Dr. Manuel Haimovici

Profa. Dra. Maira Carneiro Proietti

Prof. Dr. Luis Gustavo Cardoso

Dra. Sarah de Souza Alves Teodoro

Oc. Davi de Vasconcellos Machado

Coordenador Adjunto
PPG em Oceanografia Biológica
Instituto de Oceanografia - FURG



Mandala de peixes – Beatriz Gallo

“Será que os Peixes sonham? Choram? Riem?...

Nunca saberemos, porque vivemos entre o céu e o chão e deles é a magia das Águas.

No entanto, sentimos na Alma que algo os identifica com o mundo abissal de nosso inconsciente, onde vivem o sobressalto e o desaponto, mas também a infinita viagem de transparência Azul de uma Paz indizível...”

Norma Vasconcellos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Manuel Haimovici, pelos ensinamentos na oceanografia, ecologia e para vida. Pela amizade e por me proporcionar o desafio desta pesquisa, onde pude contribuir, por meio da genética, no seu histórico de estudos com a espécie *Umbrina canosai* (a famosa castanha!).

À minha coorientadora Máira Proietti, pelos conhecimentos na área da ecologia molecular e escrita científica, por oportunizar minha entrada no universo da genética e pela grande ajuda na preparação do manuscrito, além da sua tradução impecável para a língua inglesa.

Ao professor Luis Gustavo Cardoso do Laboratório de Demersais, pela participação como banca, assim como foi em meu TCC. Por suas valiosas sugestões, sobretudo reflexões sobre a importância deste estudo para a conservação da espécie.

À Sarah Teodoro, com quem aprendi a realizar as primeiras PCRs. Por sua indispensável ajuda no Laboratório de Ecologia Molecular Marinha, apoio logístico (e psicológico) no preparo das amostras para genotipagens e valiosas contribuições como banca.

À Ana Luzia Lacerda, por seu providencial auxílio como coautora do manuscrito, contribuindo na interpretação dos resultados por sua experiência com microsatélites, na revisão do texto e elaboração da figura sobre migração, além de me ajudar com a preparação da defesa.

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro e bolsa de mestrado.

À FURG, pela estrutura e louváveis atividades de ensino e pesquisa, pelos ensinamentos de seus professores e pelo bom humor e alegria dos seus funcionários no convívio do dia a dia.

À Maria Cristina (Cris), “oráculo” do laboratório e nossa “mãe da genética”, com quem aprendi a extração de DNA e a eletroforese. Por todos os incansáveis ensinamentos no Laboratório de Ecologia Molecular Marinha.

À Luciana Medeiros, pela ajuda (sempre bem-humorada) com os microsatélites, desde o planejamento das PCRs até a análise de dados.

Ao Lucas Rodrigues, guru para mim e para muitos outros colegas, pelas conversas sobre ciência, por suas inúmeras consultas estatísticas e pela elaboração da Figura 2 da dissertação.

Aos técnicos Marcio Freire e Roberta Barutot do Instituto de Oceanografia da FURG, pelo suporte sempre que necessário e pela amizade. Às técnicas Daiane Carrasco

e Loraine Moraes do Instituto de Ciências Biológicas da FURG, pelo auxílio na quantificação do DNA extraído.

À Vera Santos, pelo suporte e presteza na secretaria do PPGOB.

Aos professores José Muelbert e Luis André Sampaio, pelo fornecimento de referências para interpretação da dispersão larval.

À Camila Bosenbecker e Felipe Abbatepaulo da equipe Demersal, pelas amostras de Rio Grande. À Francyne Vieira e Fernanda Gonçalves da FIPERJ, pelas amostras de Niterói. À Laura Villwock e ao professor Acácio Tomas do Instituto de Pesca de São Paulo, pelas amostras de Ilhabela. Ao professor Juan Timi e Delfina Canel da Universidad Nacional Mar del Plata, pelas amostras da Argentina.

Aos grandes amigos Daniel, Sergio, Estrela e Mateus Vasconcelos, pela afetuosa acolhida no Rio de Janeiro; ao professor Acácio Tomas e Maria Soares pela hospitalidade em Santos, durante o período de amostragens em cada local.

Aos amigos João Cabral e Gabriel Pareja, pelo estimado auxílio no envio das amostras a UFRGS, e à Lucia de Oliveira pelo envio a Macrogen.

Aos amigos e colegas do PPGOB e laboratórios da oceanografia, fundamentais para caminhada no mestrado: Edwin, Luís Roberto, Pablo, Giulia, Eidi, Abner, Mariana, Danilo (Sushi), Mariano, Vinni, Raquel, Igor, Tobias, Laís, Laura, Ana Carolina, Isabela, Samanta, Gabriel, Mariana Gabriella, Ana Mai, Tainá, Bruna, Renan e Bianca.

À Pastoral Universitária e Movimento de Emaús, por auxiliar na caminhada espiritual que é o mestrado.

Às amigas Beatriz e Andréa Gallo, pela linda mandala da epígrafe.

Aos amigos de universidade, Rio Grande, Cassino e Bagé! Salve, salve!

À minha família, a quem dedico este trabalho, pelo constante incentivo na oceanografia. À minha mãe Stela que, além do incondicional amor, ajudou na edição da mandala e da foto da castanha, correção do texto e oratória para defesa. Ao Rubens, pelo auxílio nos momentos pedregosos do mestrado e constante amizade. À minha avó Norma, pelo poema da epígrafe, e ao meu avô Theo, pela motivação para a ciência, e pelo imenso amor dos dois. Ao meu pai Dioclides, pelo incentivo na minha formação profissional e por seus bordões baguais de força e peleja. Pelo constante carinho e encorajamento, por acreditarem no meu potencial: Daniela, tia Maria Luiza (em memória, por suas abençoadas orações), Bruno (Mestre), Carla, Bento, Gisele, Isadora, Isabela, Pedro, avó Otília (em memória), tia Maria do Carmo, Ramiro, Mozart, Elvira, Rodrigo, Clarissa e Eva. Muito obrigado a todos!

ÍNDICE

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
Amostragem, caracterização biológica e índice gonadossomático	14
Extração de DNA.....	15
Amplificação dos microssatélites e genotipagem.....	15
Análise de dados	20
RESULTADOS	23
Índices gonadossomáticos e estágios de maturação	23
Validação dos marcadores	24
Diversidade Genética.....	25
Estruturação Populacional e Migração	27
Efeito Gargalo e Tamanho Populacional Efetivo	30
DISCUSSÃO	31
Diversidade e estrutura populacional genética e rotas migratórias	32
Abordagens genotípica, ecológica e fenotípica para a estrutura populacional e manejo de <i>U. canosai</i>	36
Comparação com outras espécies costeiras e marcadores moleculares	38
Efeito gargalo e tamanho populacional efetivo	40
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICE 1: Manuscrito submetido	52
APÊNDICE 2: Guia para leitura de perfis de genotipagem	86
APÊNDICE 3: Dados genéticos	91

RESUMO

Compreender as características populacionais das espécies marinhas é um ponto chave para a sua conservação. Neste trabalho, marcadores microssatélites foram utilizados para avaliar a diversidade e a estrutura populacional genética da castanha *Umbrina canosai*, bem como avaliar a conectividade da espécie ao longo da maior parte da sua distribuição geográfica, investigar um possível efeito gargalo e estimar o seu tamanho populacional efetivo. Adicionalmente, a espécie teve as gônadas analisadas para associar sua desova com a dispersão larval e as análises genéticas de migração. Esta espécie da família Sciaenidae é endêmica do Atlântico Sudoeste (22°S - 41°30'S) e vem sendo intensamente explorada pela pesca industrial no sul do Brasil. Os microssatélites foram utilizados por serem altamente polimórficos, codominantes, amplamente distribuídos no genoma e por refletirem a história evolutiva recente da população devido a altas taxas de mutação. Oito *loci* de microssatélite desenvolvidos para outros cienídeos – cinco de *Micropogonias furnieri* e três de *Sciaenops ocellatus* – amplificaram para *U. canosai* e se demonstraram adequados para as análises de genética populacional, conduzidas com 128 indivíduos de cinco localidades ao longo de aproximadamente 2400 km de linha de costa (do estado do Rio de Janeiro ao norte da Argentina). As análises indicaram alta diversidade genética, uma população geneticamente homogênea, elevado fluxo gênico e ausência de efeito gargalo genético. Cada localidade recebe uma média de 11 a 22 imigrantes dos outros locais por geração, uma conectividade que pode estar sendo promovida tanto por migrantes adultos como pela dispersão larval via correntes marinhas na plataforma continental. A grande produção de ovos e larvas planctônicas e os hábitos migratórios e estritamente marinhos favorecem a alta conectividade genética de *U. canosai*. Apesar da conectividade genética entre áreas, em termos práticos, os dois estoques identificados por análises ecológicas/fenotípicas prévias – norte da Argentina ao sul do Brasil e sudeste do Brasil – devem ser considerados para propostas de manejo.

PALAVRAS-CHAVE: conectividade genética, migração, peixe marinho, efeito gargalo, ecologia molecular.

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF ARGENTINE CROAKER (*Umbrina canosai*, Sciaenidae) IN THE SOUTHWESTERN ATLANTIC INFERRED BY MICROSATELLITES

ABSTRACT

Understanding the population features of marine species is a key point for their conservation. In this work, microsatellite markers were used to evaluate the genetic diversity and the genetic population structure of the Argentine croaker *Umbrina canosai*, as well as to evaluate the connectivity of the species throughout most of its geographic distribution, to investigate a putative bottleneck and to estimate its effective population size. This species belongs to Sciaenidae family, is endemic to Southwestern Atlantic (22°S - 41°30'S) and has been intensively exploited by industrial fisheries in southern Brazil. Microsatellites were used since they are highly polymorphic, codominant, widely distributed throughout the genome and reflect the recent evolutionary history of the population due to high mutation rates. Eight microsatellite loci developed for other sciaenids – five from *Micropogonias furnieri* and three from *Sciaenops ocellatus* – amplified for *U. canosai* and were suitable for population genetic analysis, conducted with 128 individuals from five locations along about 2400 km of coastline (from Rio de Janeiro state to the northern Argentina). The analyses indicated high genetic diversity, a genetically homogeneous population, extensive gene flow and lack of genetic bottleneck event. Each location receives an average of 11 to 22 immigrants from other areas per generation, a connectivity that may be promoted both by adult migrants and by the larval dispersion via marine currents along the continental shelf. The large production of planktonic eggs and larvae and the migratory and strictly marine habits favor the high genetic connectivity of *U. canosai*. Despite being genetically connected among areas, in practical terms the two stocks identified by ecological/phenotypic analyses – north of Argentina to southern Brazil and southeastern Brazil – should be considered for management proposals.

KEY WORDS: genetic connectivity, migration, marine fish, bottleneck, molecular ecology.

INTRODUÇÃO

A identificação de populações de espécies marinhas contribui para a compreensão de sua ecologia e biogeografia, além de ser um dos temas centrais para o manejo sustentável dos recursos pesqueiros (Cadrin et al. 2014) e para a conservação de espécies e da integridade dos ecossistemas (Torres-Florez et al. 2018). Uma população pode ser definida como um grupo de indivíduos da mesma espécie, que interagem e reproduzem entre si, mantendo certo grau de isolamento reprodutivo das demais populações da espécie. Dessa forma, cada população é autossustentável reprodutivamente, apresenta uma integridade genética característica e está geralmente associada a um local específico dentro da distribuição geográfica da espécie (Waples & Gaggiotti 2006, Secor et al. 2014). A maneira com que a variação genética se distribui dentro e entre populações é conhecida como estruturação populacional genética, e pode indicar o nível de fluxo gênico entre localidades (Laikre et al. 2005).

Dentro do manejo de peixes e outros organismos marinhos também são definidos os estoques, um termo multidisciplinar que pode possuir diferentes significados dependendo do contexto (Carvalho & Hauser 1994). Na biologia pesqueira, o termo estoque é usado para definir um grupo de peixes explorado em uma determinada área, com base em referenciais práticos para atividade pesqueira (Gulland, 1983). Na área da genética, estoques identificados por marcadores moleculares são considerados sinônimos de populações (Carvalho & Hauser 1994). Unidades homogêneas para propostas de exploração e manejo de recursos pesqueiros são conhecidas como estoques unitários (*sensu* Cadrin et al. 2014), que são definidos baseados em critérios fenotípicos, ecológicos ou genotípicos e correspondem a unidades de manejo (Begg & Waldman 1999). Mais recentemente, o conceito de estoque unitário incorporou outros fatores, como as áreas de atuação das pescarias e limites jurisdicionais dos países (Cadrin et al. 2014).

As características genéticas de populações são comumente determinadas a partir de marcadores moleculares neutros, que possuem a vantagem de serem pouco influenciados pelo ambiente. As análises de genética populacional são baseadas na comparação dos genótipos dos indivíduos de regiões distintas, identificando as possíveis diferenças genéticas entre elas (Zanella et al. 2017). Esta identificação é importante para a gestão dos recursos pesqueiros, já que o manejo de várias populações como uma única população pode resultar em depleção da variação genética (Laikre et al. 2005). Com marcadores moleculares, é possível avaliar o declínio populacional de espécies

exploradas, identificando possíveis efeitos gargalo (*bottlenecks* – evento de declínio populacional acentuado, causando decréscimo na diversidade genética) e estimando os tamanhos populacionais efetivos (N_e) (Marini & Bekkevold 2014). Adicionalmente, análises moleculares podem inferir fluxo gênico e migrações (Beerli & Felsenstein 1999), muitas vezes difíceis de observar diretamente em organismos marinhos como peixes de fase larval planctônica, onde a dispersão do ictioplâncton depende das massas d'água atuantes, feições oceanográficas e locais de desova (Macedo-Soares et al. 2014). Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os microsatélites têm se destacado como uma excelente técnica para o estudo da diversidade e estrutura genética de populações, assim como a conectividade entre elas (Selkoe & Toonen 2006).

Dentre o vasto DNA satélite, formado por sequências nucleotídicas repetitivas, encontram-se os microsatélites (Garrido-Ramos 2017). Os microsatélites apresentam unidades de repetição curtas (de um a seis nucleotídeos), que podem repetir de 5 a 100 vezes. O número dessas repetições pode diferir entre indivíduos para o mesmo microsatélite; consequentemente, pode haver alelos de tamanhos muito distintos para um mesmo *locus* de diferentes indivíduos, caracterizando polimorfismos genéticos (Selkoe & Toonen 2006, Madesis et al. 2013). Esses marcadores moleculares são codominantes, pois é possível avaliar ambos os alelos e distinguir homozigotos (quando os dois alelos amplificados para o mesmo *locus* têm o mesmo tamanho) de heterozigotos (quando os dois alelos têm tamanhos diferentes). Os alelos são transmitidos entre gerações, e alguns deles podem ser únicos para populações específicas. Para identificar geneticamente as populações, índices estatísticos são utilizados para comparar a frequência dos alelos entre diferentes localidades (Zanella et al. 2017).

Organismos procariotos e eucariotos apresentam microsatélites distribuídos amplamente nos seus genomas (Zanella et al. 2017). As informações contidas nos microsatélites representam as gerações mais recentes de uma população, já que estes marcadores apresentam altas taxas de mutação, variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos de mutação por *locus* por geração, uma taxa 100 a 1000 vezes mais alta em relação à maioria do DNA nuclear (Wan et al. 2004). As sequências de DNA que flanqueiam cada microsatélite são geralmente conservadas em indivíduos da mesma espécie, sendo utilizadas como iniciadores (*primers*) específicos para amplificar esse tipo de marcador por meio da Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Por isso, uma de suas limitações é ser espécie-específico, sendo necessário conhecer os microsatélites da espécie estudada ou

testar a sua adaptabilidade a partir de espécies filogeneticamente próximas (Selkoe & Toonen 2006).

A família Sciaenidae engloba peixes que habitam fundos arenosos ou lodosos, a maioria deles marinhos e costeiros, desde ambientes tropicais a temperados, sendo muitos deles recursos pesqueiros (Longhurs & Pauly 1987; Nelson et al. 2016). A castanha (*Umbrina canosai*, Berg 1895) é um cienídeo demersal, endêmico do Atlântico Sudoeste, distribuído entre o Rio de Janeiro (22° S) no Brasil e o Golfo de São Matias na Argentina (41° 30' S) (Cousseau & Perrota 1998). A espécie atinge mais de 400 mm de comprimento total e apresenta crescimento lento e longevidade superior a 20 anos (Haimovici & Reis 1984). Assim como outros Sciaenidae, *U. canosai* emite sons em situação de ameaça e durante a época reprodutiva, com pulsos e frequência espécie-específicos (Tellechea et al. 2017a). Alimenta-se de organismos bentônicos, principalmente crustáceos e poliquetas quando juvenis, adicionando também equinodermos, moluscos e peixes à dieta dos adultos (Haimovici et al. 1989). A espécie é predada por diferentes componentes do nécton, como a toninha (*Pontoporia blainvillei* (Tellechea et al. 2017b) o boto-cinza *Sotalia guianensis* (Lopes et al. 2012), o tubarão-bico-de-cristal *Galeorhinus galeus* (Lucifora et al. 2006), a anchova *Pomatomus saltatrix* e a pescada-olhuda *Cynoscion guatucupa* (Lucena et al. 2000). Assim como em outros teleósteos, a biologia e os ciclos reprodutivos de *U. canosai* são conhecidos por meio da análise de suas gônadas (Haimovici & Cousin 1989, Militelli et al. 2013).

A espécie é abundante nos meses de verão na plataforma continental do norte da Argentina, utilizada principalmente como área de alimentação (Gonzalez Alberdi & Nani 1967). No outono, os cardumes migram ao norte e, durante o inverno e primavera, reproduzem na costa do Rio Grande do Sul ao Cabo de Santa Marta Grande, em Santa Catarina (33°50' a 28°40'S) (Haimovici & Cousin 1989). As fêmeas maiores e mais velhas, consequentemente mais fecundas, são as primeiras a chegar à plataforma continental do Rio Grande do Sul para a desova, realizada em parcelas, e também são as primeiras a retornar às áreas de alimentação ao sul, no Uruguai e Argentina (Haimovici & Cousin 1989). No Rio Grande do Sul, os juvenis se desenvolvem em águas costeiras durante a primavera e o verão, e migram para a plataforma intermediária durante o outono, onde permanecem até completarem cerca de dois anos de vida e maturarem sexualmente (Haimovici et al. 1996). Algumas fêmeas desovantes também são observadas na costa do Uruguai e Argentina no final da primavera (Militelli et al. 2013), e poucos adultos permanecem na costa do Rio Grande do Sul no verão, sugerindo que

existam outros padrões migratórios para *U. canosai* e que alguns indivíduos são residentes do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Kikuchi et al. no prelo).

O conhecimento sobre a biologia da espécie do Cabo de Santa Marta Grande ao Rio de Janeiro se restringe a prospecções pesqueiras (Zaneti-Prado 1979, Haimovici et al. 2007, 2008, 2017; Kikuchi et al. no prelo), mas a ocorrência de juvenis indica que *U. canosai* também se reproduz nessa região (Haimovici et al. 2008). A existência de dois estoques de *U. canosai* – um do norte da Argentina ao Sul do Brasil e outro no Sudeste do Brasil – foi proposta por Zaneti Prado & Vazzoler (1976) baseada no tamanho de primeira maturação, e esta hipótese foi mantida em trabalhos posteriores (Haimovici & Cousin 1989, Haimovici et al. 2006, 2008). Recentemente, avaliações ecológicas e fenotípicas corroboraram essa estrutura. Canel et al. (2019) encontraram que os indivíduos do norte da Argentina e do Rio Grande do Sul apresentam uma assembleia parasitária distinta dos indivíduos do Rio de Janeiro. Similarmente, Kikuchi et al. (no prelo) identificaram que *U. canosai* possui crescimento e forma do otólito *sagitta* diferentes entre estas duas regiões.

U. canosai é pescada ao longo de toda sua distribuição geográfica, com maiores capturas no Sul do Brasil (Haimovici et al. 2006, Kikuchi et al. no prelo). A sua exploração pela pesca industrial começou em 1970, pelas frotas de arrasto de fundo, e em 1973 sua captura no Atlântico Sudoeste alcançou um pico de 26700 toneladas. A partir do final dos anos 1980, essa espécie passou a ser alvo também da pescaria de emalhe de fundo. Nos anos seguintes, as capturas totais decresceram sensivelmente, chegando a menos de 6000 t em 1998, mas aumentaram para em torno de 15000 t nos anos 2000 (Haimovici et al. 2006). Entretanto, em anos recentes, a espécie passou a ser pescada também pelo arrasto de meia água, que captura mais eficientemente cardumes de adultos grandes e maduros da plataforma externa, que são fundamentais para a renovação da população por serem mais fecundos (Haimovici & Cardoso 2016). Com a intensa pressão pesqueira das últimas décadas, *U. canosai* está em risco de colapso pesqueiro na porção sul da sua distribuição (Haimovici & Cardoso 2016), podendo sofrer perdas na sua diversidade genética e consequentemente reduzir a sua adaptabilidade frente a mudanças ambientais drásticas (Smith et al. 1991).

Embora *U. canosai* seja um importante recurso pesqueiro, as características genéticas de suas populações ainda não são conhecidas. Desta forma, este trabalho utilizou marcadores microsatélites para identificar a diversidade e a estrutura populacional genética da espécie, assim como avaliar a conectividade ao longo da sua

distribuição no Atlântico Sudoeste, investigar um possível efeito gargalo e estimar seu tamanho populacional efetivo. Adicionalmente, a espécie teve as gônadas analisadas para inferir sobre sua reprodução no Sudeste do Brasil, onde é pouco conhecida, e associar sua desova com a dispersão larval e as análises genéticas de migração. Testamos as hipóteses de que a espécie é dividida em duas populações – uma da Argentina ao Sul do Brasil e outra no Sudeste do Brasil – e que ela sofreu efeito gargalo provocado pela intensa pressão pesqueira.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem, caracterização biológica e índice gonadosomático

Exemplares adultos de castanha (*Umbrina canosai*), medindo de 225 a 436 mm de comprimento total, foram coletados em cinco localidades ao longo da distribuição geográfica da espécie no Atlântico Sudoeste, correspondendo a aproximadamente 2400 km de linha de costa: Niterói (RJ), Ilhabela (SP) e Rio Grande (RS) no Brasil, e San Clemente del Tuyú e Necochea na Província de Buenos Aires, Argentina (Figura 1). As amostras foram obtidas da pesca comercial de arrasto e emalhe, por meio de diferentes instituições parceiras, entre os anos de 2017 e 2019 (Tabela 1).

De cada exemplar foi registrado o sexo, comprimento total (mm), peso total (g), peso de gônada (precisão de 0,01g) e estágio de maturação gonadal (classificação macroscópica). O índice gonadosomático (IG) de cada indivíduo foi calculado seguindo a equação $IG = 100 \times (W_G/W_T)$, onde W_G é o peso da gônada e W_T é o peso total do indivíduo (Haimovici & Cousin 1989). Não houve avaliação das gônadas para as amostras oriundas da Argentina. Uma subamostra de cada localidade foi selecionada para as análises moleculares (detalhes na Tabela 1), sendo coletado um pedaço de 2 g de tecido muscular do dorso de cada indivíduo e acondicionado em tubos etiquetados. Os tubos foram preenchidos primeiramente com etanol 70% durante a amostragem e, posteriormente, substituído por etanol absoluto para estocagem a -20 °C até a etapa de extração de DNA.

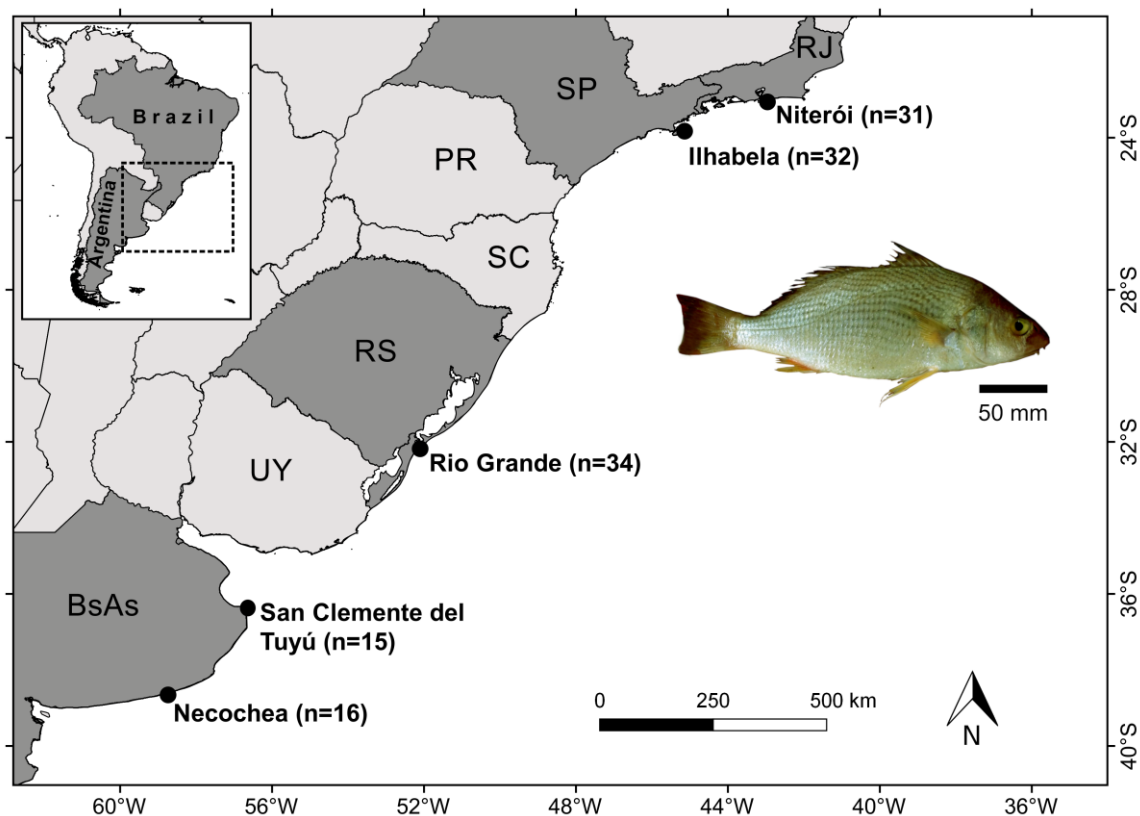


Figura 1: Mapa da região de amostragem. Pontos indicam as localidades de coleta da castanha *Umbrina canosai* ao longo da sua distribuição no Atlântico Sudoeste, situadas nos Estados do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS) no Brasil; e na Província de Buenos Aires (BsAs) na Argentina (cinza escuro). Outras localidades mencionadas no texto: Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) no Brasil e Uruguai (UY) (cinza claro).

Extração de DNA

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído separadamente utilizando o método de extração salina (Aljanabi & Martinez 1997). A concentração e pureza dos DNAs foram quantificadas com espectrofotômetro BioDrop™ (Biochrom™). As concentrações de DNA foram padronizadas para uma faixa de 35 a 65 ng/μL (~50 ng/μL), através de diluição em água ultrapura, previamente à amplificação dos marcadores microsatélites.

Amplificação dos microsatélites e genotipagem

Os *loci* microsatélites foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Como até o momento a literatura não reporta

iniciadores (*primers*) específicos para *Umbrina canosai*, foram testados doze *primers* de outras espécies de cieniídeos: 1) *primers* para oito *loci* microssatélites, desenvolvidos para a corvina *Micropogonias furnieri* e polimórficos para *U. canosai*: *Mfur02*, *Mfur03*, *Mfur06*, *Mfur13*, *Mfur14*, *Mfur19*, *Mfur25* e *Mfur26* (Vasconcellos 2012); e 2) *primers* para quatro *loci* microssatélites, desenvolvidos para o corvinão-de-pintas *Sciaenops ocellatus* (Turner et al. 1998) e polimórficos para *M. furnieri* (D'Anatro et al. 2011): *Soc049*, *Soc050*, *Soc085* e *Soc204*.

As PCRs foram realizadas com as fluorescências 6-FAM, HEX e NED (Tabela 2) para permitir a identificação dos diferentes *loci* durante a genotipagem, seguindo o método de Schuelke 2000. Cada *primer forward* foi sintetizado com uma cauda M13, que é uma sequência de anelamento universal, posicionada em sua extremidade 5'. Além dos *primers forward* e *reverse*, foi adicionado à reação um terceiro *primer*, constituído por uma fluorescência também com cauda M13. A PCR foi conduzida com o *primer forward* a um quarto da concentração do *primer reverse*; dessa forma, o *primer forward* incorpora a cauda M13 aos fragmentos sintetizados durante os primeiros ciclos e logo se esgota, por estar em menor concentração. Em seguida, o *primer* universal M13 passa a ser utilizado como *primer forward* na reação e incorpora a fluorescência aos fragmentos (Schuelke 2000, Blacket et al. 2012).

As reações foram feitas em um volume total de 20 µL, contendo: 1 x de tampão (*Buffer*), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,13 µM do *primer forward* (contendo cauda M13), 0,5 µM do *primer reverse*, 0,25 µM de fluorescência (também contendo cauda M13), 1 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e ~50 ng/µL de DNA genômico molde, aferidas com água ultrapura (Schuelke 2000, Vasconcellos et al. 2015). Para cada reação de PCR foi incluída uma amostra sem DNA molde (controle negativo), visando detectar possíveis contaminações durante a amplificação.

As PCRs foram realizadas em um termociclador Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems). As condições de termociclagem dos microssatélites de *M. furnieri* foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento dos *primers* de microssatélite a 62 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 45 s; seguido de oito ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento da cauda M13 com fluorescência a 53 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 45 s; e, por fim, extensão final a 72 °C por 30 min (Vasconcellos 2012, Vasconcellos et al. 2015). As condições de termociclagem dos microssatélites de *S. ocellatus* foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento dos *primers* de

microssatélite a 60-62 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s; seguido de oito ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento da cauda M13 com fluorescência a 53 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 45 s; e, por fim, extensão final a 72 °C por 30 min (D'Anatro et al. 2011). Os últimos oito ciclos e a longa extensão final em ambas as termociclagens promovem a incorporação da fluorescência aos fragmentos amplificados (Schuelke 2000).

Para verificar o resultado da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8 – 2,0% com um marcador de peso molecular (*ladder*), imerso em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1 X, utilizando o corante intercalante de ácidos nucleicos Gel Red (0,001%), em um transiluminador U.V. Dos *primers* testados, *Mfur13* e *Soc049* foram descartados por não amplificarem as amostras de *U. canosai* analisadas neste estudo. Dessa forma, as PCRs e genotipagens prosseguiram com os dez *loci* restantes.

Cada marcador microssatélite foi amplificado separadamente (*singleplex*), exceto os marcadores *Mfur19* e *Mfur25*, que foram amplificados simultaneamente (*multiplex*) por apresentarem faixas de tamanhos distintas, não havendo o risco de sobreposição na leitura da genotipagem (Guichoux et al. 2011). As PCRs *multiplex* foram efetuadas com 2 x de tampão (Markoulatos et al. 2002), com ambos os pares de *primers* e o dobro da concentração de fluorescência. Para as amostras que não amplificaram ou que produziram produto de PCR com baixa concentração, repetimos as reações de PCR aumentando a concentração de dNTP para 0,3 mM e de Platinum *Taq* DNA Polimerase para 1,5 U. Para maximizar o número de marcadores por genotipagem, combinamos os produtos de PCR amplificados com fluorescências diferentes em uma mesma leitura (*poolplex*, Tabela 2) (Guichoux et al. 2011). As concentrações dos produtos de PCR foram estimadas com base no marcador de peso molecular utilizado na eletroforese. As amostras com mais de 80 ng/μL foram diluídas 50% em água ultrapura durante a montagem das placas destinadas à genotipagem. Por fim, a genotipagem foi feita em sequenciador automático na empresa MacroGen (Coreia do Sul, dna.macrogen.com).

Tabela 1: Procedência e caracterização dos exemplares de *Umbrina canosai* do Atlântico Sudoeste utilizados para as análises moleculares, com o país, a localidade, instituição parceira que disponibilizou os espécimes, arte de pesca utilizada, período de amostragem, profundidade (m), número de indivíduos amostrados (N), sexo, comprimento total (mm) e peso total (g) dos indivíduos.

País	Local	Instituição de coleta	Arte de pesca	Período	Profundidade	N	Sexos	Comprimentos totais	Pesos totais
Brasil	Niterói (RJ)	Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)	Arrasto de fundo (industrial)	Fev/2019	80 - 120 m	31	15 ♀ 16 ♂	282 – 361 mm	250 – 542 g
	Ilhabela (SP)	Instituto de Pesca de São Paulo	Emalhe (artesanal)	Set/2019	16 - 25 m	32	15 ♀ 17 ♂	250 – 303 mm	227 – 387 g
	Rio Grande (RS)	Universidade Federal do Rio Grande (FURG)	Arrasto de fundo, arrasto de meia-água e emalhe (industriais)	Ago e Set/2018	18 - 105 m	34	18 ♀ 16 ♂	225 – 411 mm	144 – 982 g
Argentina	San Clemente del Tuyú (SCT)	Universidad Nacional Mar del Plata (UNMDP)	Arrasto de fundo (industrial)	Jan/2019	-	15	-	310 – 405 mm	388 – 824 g
	Necochea (NEC)			Abr/2017	-	16	10 ♀ 5 ♂ 1 s.d.	250 – 355 mm	238 – 528 g

Análise de dados

A leitura dos perfis de genotipagem foi realizada no programa PEAK SCANNER™ 1.0 (Applied Biosystems) (fase de *calling*). Os dez marcadores genotipados possuíam artefatos de repetição do tipo *stutter*, ou algum outro artefato de PCR. Os marcadores *Mfur14* e *Mfur26* apresentaram picos duplos, com 1 pb de diferença entre eles, por adição de uma adenina; nestes casos, o primeiro pico foi escolhido para representar o alelo, de acordo com Guichoux et al. (2011). Os *loci* marcados com fluorescência NED sofreram uma fraca interferência (sinal *pull-up*) da fluorescência de calibração ROX. Os picos verdadeiros (alelos) foram diferenciados manualmente dos picos *stutter* e demais tipos de artefatos seguindo os padrões descritos na literatura (e.g., Selkoe & Toonen 2006 Apêndice S2, Arif et al. 2010, Guichoux et al. 2011, Flores-Rentería & Krohn 2013). As classes de alelos foram estabelecidas com o pacote MsatAllele 1.05 (Alberto 2009) do programa R versão 4.0.2 (R Development Core Team, www.r-project.org), com posterior verificação manual (fase de *binning*), para que os alelos seguissem o motivo de repetição de cada microsatélite (di- ou trinucleotídeo) (detalhes no Apêndice 2).

O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) foi utilizado para identificar e ajustar os genótipos dos *loci* e localidades com alelos nulos (falhas na amplificação de alelos). Nenhum *loci* teve os dados afetados por picos tipo *stutter* nem por amplificação preferencial de alelos pequenos (*large allele dropout*). No entanto, todas as localidades apresentaram alelos nulos por excesso de homozigotos em algum *locus*, sobretudo as localidades de Niterói e Ilhabela (Tabela 4). O ajuste exclui os homozigotos excedentes e repõe heterozigotos perdidos, utilizando os alelos disponíveis de cada marcador e seguindo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os arquivos de entrada para cada análise foram formatados pelos programas CONVERT 1.31 (Glaubitz 2004) e PGDSPIDER 2.1.1.5 (Lischer & Excoffier 2012).

Os programas GENEPOP 4.7.5 versão online (Raymond & Rousset 1995), FSTAT 2.9.4 (Goudet 2001) e ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) foram utilizados para calcular as frequências alélicas e os índices de diversidade genética: número de alelos (N_A), riqueza alélica (A_R , uma medida de diversidade genética independente do tamanho amostral), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o desequilíbrio de ligação foram testados no GENEPOP por meio da Cadeia de Markov, com 10.000 desmemorizações (passos de aquecimento), 1.000 lotes (número de cadeias) e 10.000

iterações por lote (número de valores gerados por cada cadeia). A correção de Bonferroni foi utilizada para ajustar o nível de significância em testes múltiplos: $\alpha_{\text{Bonf.}} = \alpha/k$, onde $\alpha = 0,05$ e k = número de testes sob a mesma hipótese nula (Rice, 1989).

A estrutura genética foi investigada entre pares de localidades pelo teste G exato de diferenciação populacional no GENEPOP (Cadeia de Markov com os mesmos parâmetros descritos acima) e por estimativas de F_{ST} no ARLEQUIN. Duas Análises Moleculares de Variância (AMOVA) independentes foram conduzidas no ARLEQUIN, cada uma com 10.000 permutações: 1) comparação entre os grupos regionais Sudeste (RJ+SP) vs. Sul (RS+SCT+NEC); 2) comparação entre todas as localidades, sem agrupamentos. Adicionalmente, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) que atribui indivíduos de genótipo semelhante à população mais provável. Para isso, foram simuladas 1 a 5 populações (K), com 10 réplicas cada, por meio de uma Cadeia de Markov e Monte Carlo com 100.000 passos de aquecimento, seguidos de 200.000 passos de simulação. O número mais provável de K populações foi escolhido avaliando três critérios: primeiro, a probabilidade dos indivíduos pertencerem a cada K população; segundo, o maior $L(K)$, logaritmo da probabilidade dos dados para cada K; e terceiro, o maior ΔK , que indica o número mais provável de populações segundo o método de Evanno et al. 2005, calculado no programa online STRUCTURE HARVESTER 6.94 (Earl & vonHoldt 2012).

A migração entre as localidades foi estimada pelo programa MIGRATE 4.0 (Beerli & Felsenstein 1999), que emprega uma abordagem Bayesiana baseada na teoria da coalescência. A análise foi feita com as configurações padrão do programa e o modelo de movimento Browniano, mais indicado para marcadores microsatélites, que é uma aproximação do modelo de mutação passo a passo (*stepwise mutation model*, onde a mutação do microsatélite adiciona ou remove apenas uma repetição). As distribuições posteriores fornecem as médias do tamanho populacional em escala de mutação (θ) e a taxa de imigração em escala de mutação (M). Esses dois parâmetros podem ser decompostos em $\theta = 4N_e\mu$, onde o coeficiente 4 é utilizado para organismos diploides, N_e é o tamanho populacional efetivo e μ é a taxa de mutação por geração; e em $M = m/\mu$, onde m é a taxa de imigração por geração. Para o MIGRATE, os valores N_e , μ e m não necessariamente são conhecidos (Beerli 2004). O tempo geracional depende da literatura e para *U. canosai* é em torno de dois anos (Haimovici & Cousin 1989). Com θ e M , é possível calcular o número de imigrantes por geração (γ) em cada localidade seguindo: $\gamma_{ab} = \theta_b.M_{ab}$ (Beerli 2004).

Para verificar se *U. canosai* sofreu declínio populacional recente na região de estudo, três métodos de efeito gargalo (*bottleneck*) foram aplicados: primeiro, o excesso de heterozigosidade pelo teste de Wilcoxon (maior poder estatístico para dados com menos de 20 *loci*), realizado com 10.000 iterações no programa BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al. 1999). Este teste compara a heterozigosidade esperada sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) com a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio mutação-deriva (H_{EQ}), estimadas pelas frequências alélicas. O efeito gargalo é inferido quando há excesso significativo de heterozigosidade $H_E > H_{EQ}$, já que H_{EQ} decai mais rapidamente com a perda de alelos raros (Luikart & Cornuet 1998). Para comparação, H_{EQ} foi calculado por três modelos mutacionais: 1) modelo de alelos infinitos (*infinite alleles model*), onde a mutação do microssatélite adiciona ou remove qualquer número de repetições; 2) modelo passo a passo (*stepwise mutation model*, conforme descrito acima); e 3) modelo de duas fases (*two phase model*), um modelo intermediário entre os dois anteriores. Os parâmetros do modelo de duas fases foram escolhidos seguindo Peery et al. (2012): variância de mutações com mais de uma repetição $\sigma_g^2 = 12$ (correspondente a média $\delta_g = 3,1$) e 78% de mutações de uma repetição (22% de mutações de mais de uma repetição).

O segundo método utilizado para verificar o efeito gargalo foi o teste gráfico de déficit de alelos raros, também calculado pelo BOTTLENECK, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Para populações estáveis, espera-se que a distribuição de frequência de alelos tenha uma moda na classe de alelos raros, compondo um histograma em forma de L. Quando há efeito gargalo, alelos raros são perdidos e a distribuição muda de forma (Luikart et al. 1998). O terceiro método foi o valor M de Garza & Williamson (2001), calculado no ARLEQUIN, que é a razão entre o número de alelos (N_A) e o intervalo de tamanho do microssatélite em número de repetições (*range*, r). Para populações em declínio, é esperado que o número de alelos reduza mais rapidamente do que o intervalo dos tamanhos, conforme os alelos vão sendo perdidos. É assumido efeito gargalo para populações com o $M < 0,68$ (valor crítico) (Garza & Williamson 2001).

O tamanho populacional efetivo (N_e) foi estimado pelo programa COLONY 2.0.6.5 (Jones & Wang 2010), considerando machos e fêmeas de *U. canosai* como poligâmicos e mantendo todas as configurações padrão do programa. O COLONY estima relações de parentesco entre os indivíduos da amostra, e o N_e é inferido com a lógica de que quanto menor o N_e de uma população, maior será a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso serem irmãos ou meio irmãos (Wang 2009).

RESULTADOS

Índices gonadossomáticos e estágios de maturação

Os índices gonadossomáticos médios por localidade, para fêmeas e machos, respectivamente, foram: 1,66 e 1,21 em Niterói (fevereiro); 3,18 e 1,68 em Ilhabela (setembro); 2,33 e 1,80 em Rio Grande (agosto); 4,90 e 3,97 em Rio Grande (setembro) (Tabela 3). Qualitativamente, em Ilhabela e Rio Grande, foram mais frequentes gônadas em maturação e em maturação avançada. Em Niterói, foram mais frequentes gônadas em recuperação e desovadas. A Figura 2 associa os índices gonadossomáticos médios deste estudo aos valores encontrados nos respectivos meses por Haimovici & Cousin (1989) para o sul da distribuição da espécie.

Tabela 3: Índices gonadossomáticos médios de fêmeas e machos de *Umbrina canosai* por localidade no Atlântico Sudoeste, com tamanho amostral (N), desvio padrão (DP) e intervalo de confiança inferior (IC₉₅ -) e superior (IC₉₅ +). Amostras da Argentina não tiveram gônadas analisadas.

		Média	N	DP	IC ₉₅ -	IC ₉₅ +
Niterói (fevereiro)	Fêmeas	1,66	27	0,58	1,43	1,88
	Machos	1,21	70	0,55	1,08	1,34
Ilhabela (setembro)	Fêmeas	3,18	43	0,96	2,89	3,46
	Machos	1,68	79	1,68	1,31	2,05
Rio Grande (agosto)	Fêmeas	2,33	26	2,37	1,42	3,24
	Machos	1,80	20	1,34	1,21	2,39
Rio Grande (setembro)	Fêmeas	4,90	26	1,94	4,15	5,64
	Machos	3,97	15	2,60	2,66	5,29

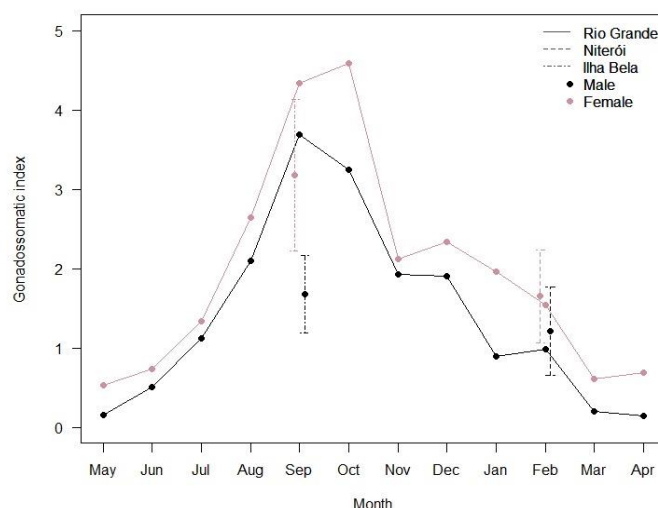


Figura 2: Índices gonadosomáticos (IGs) médios de fêmeas e machos da castanha *Umbrina canosai* ao longo do ano. Pontos com linhas contínuas: Rio Grande, dados de Haimovici & Cousin (1989). Pontos com barras de erro tracejadas (desvio padrão): Niterói e Ilhabela, dados deste trabalho. Os IGs das fêmeas de Ilhabela em setembro foram associados à época de maturação sexual, enquanto os IGs das fêmeas de Niterói em fevereiro foram associados ao período pós-desova.

Validação dos marcadores

Foram utilizados os genótipos de 128 indivíduos das cinco localidades (genótipos e frequências alélicas no Apêndice 3). Os dez *loci* genotipados foram polimórficos, somando em conjunto 253 alelos detectados (Tabela 2). Os marcadores foram validados tomando como critérios a frequência estimada de alelos nulos (alelos nulos enviesam o coeficiente de endocruzamento) (Tabela 4), desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5) e desequilíbrio de ligação. O marcador *Mfur26* apresentou a maior frequência estimada de alelos nulos (média = 0,331). O ajuste de genótipos pelo Micro-Checker corrigiu seus desvios de Hardy-Weinberg (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,001$), mas produziu muitos dados faltantes ao excluir os homozigotos excedentes. O marcador *Mfur19* também apresentou elevada frequência estimada de alelos nulos (média = 0,207) e teve desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas localidades SP, RS e NEC (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,001$), mesmo após o ajuste dos genótipos. Os marcadores *Mfur02*, *Mfur03*, *Mfur06*, *Mfur14* e *Soc204* acusaram alelos nulos em algumas localidades, com a média das frequências estimadas próxima ou inferior a 0,10. Alguns desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados mesmo após o ajuste dos genótipos: *Mfur02* em

RJ; *Mfur03* em SP e RS; *Mfur06* em RJ e SP; *Mfur14* em NEC (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,001$). Os marcadores *Mfur25*, *Soc050* e *Soc085* não apresentaram alelos nulos significativos e nem desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os maiores valores de coeficientes de endocruzamento ($F_{IS} > 0,30$) estiveram associados a *loci* com alelos nulos ou com desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, especialmente aos *outliers* *Mfur19* (F_{IS} médio 0,367) e *Mfur26* (F_{IS} médio 0,505). Devido aos problemas relatados, os marcadores *Mfur19* e *Mfur26* foram excluídos de todas as análises posteriores. Foram mantidos então oito *loci*, considerados independentes por não possuírem desequilíbrios de ligação (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,0002$), e assumindo que as análises não foram prejudicadas por seus poucos desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4: Frequência de alelos nulos para cada *locus* de microsatélite de cada localidade, estimada pelo programa MICRO-CHECKER para *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste. Asteriscos indicam alelos nulos significativos. Os *loci* *Mfur19* e *Mfur26* foram excluídos das análises posteriores.

<i>Locus</i>	Niterói	Ilhabela	Rio Grande	San Clemente del Tuyú	Necochea	Média
<i>Mfur02</i>	0,112*	0,036	0,034	0,096*	0,025	0,061
<i>Mfur03</i>	0,180*	0,207*	0,189*	0,014	-0,007	0,117
<i>Mfur06</i>	0,210*	0,141*	0,005	0,134*	0,038	0,106
<i>Mfur14</i>	0,161*	0,077	0,068*	-0,006	0,234*	0,107
<i>Mfur19</i>	0,330*	0,283*	0,134*	0,123*	0,166*	0,207
<i>Mfur25</i>	0,040	-0,023	-0,018	-0,048	-0,050	-0,020
<i>Mfur26</i>	0,364*	0,405*	0,382*	0,205*	0,299*	0,331
<i>Soc050</i>	0,027	0,051	0,012	0,080	-0,017	0,030
<i>Soc085</i>	0,056	0,025	0,015	0,066	0,031	0,038
<i>Soc204</i>	0,119	0,144*	0,021	-0,022	-0,103	0,032

Diversidade Genética

A Tabela 5 apresenta os índices de diversidade genética para os oito *loci* analisados, somando 217 alelos detectados. O trinucleotídeo *Soc204* foi o marcador menos diverso, com 11 alelos detectados, enquanto os sete *loci* dinucleotídeos apresentaram mais de 20 alelos cada, chegando a 35 alelos identificados para *Soc085*. A riqueza alélica variou de 3,387 (*Soc204* em NEC) a 11,026 (*Mfur25* em SCT); a heterozigosidade observada variou de 0,533 (*Mfur06* em RJ) a 1 (*Mfur25* em SCT e NEC); a heterozigosidade esperada variou de 0,559 (*Soc204* em NEC) a 0,967 (*Mfur25*

em SCT) e o coeficiente de endocruzamento variou de -0,077 (*Soc204* em NEC) a 0,451 (*Mfur06* em RJ) (Tab. 3). A H_O foi maior em Rio Grande (média 0,817) e menor em Niterói (média 0,697), localidade que também apresentou o maior F_{IS} (média 0,229). A A_R e H_E apresentaram médias similares entre as localidades. As médias totais para os índices de diversidade foram: $A_R = 8,983$; $H_O = 0,770$; $H_E = 0,895$; e $F_{IS} = 0,140$.

Tabela 5: Diversidade genética de *Umbrina canosai* do Atlântico Sudoeste, avaliada por oito *loci* de microssatélites. Para cada *locus* e cada localidade, são apresentados o número de genótipos utilizados (N), número de alelos (N_A), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), probabilidade de conformidade ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Asteriscos indicam os desvios significativos do HWE depois da correção de Bonferroni de $\alpha < 0,001$.

<i>Locus</i>	Índice	Niterói (RJ)	Ilhabela (SP)	Rio Grande (RS)	San Clemente del Tuyú (SCT)	Necochea (NEC)
<i>Mfur02</i>	N	26	26	33	15	16
	N_A	17	16	25	16	17
	A_R	9,468	9,161	10,645	9,759	10,311
	H_O	0,7308	0,8462	0,8788	0,7333	0,8750
	H_E	0,9344	0,9269	0,9552	0,9333	0,9496
	HWE	*0,0006	0,5473	0,4410	0,0164	0,3782
	F_{IS}	0,221	0,089	0,081	0,22	0,081
<i>Mfur03</i>	N	9	14	23	7	10
	N_A	10	16	20	11	12
	A_R	8,732	10,396	10,936	11	9,643
	H_O	0,5556	0,5714	0,6087	0,8571	0,9000
	H_E	0,9085	0,9524	0,9623	0,9560	0,9368
	HWE	0,0034	*0,0001	*0,0000	0,3337	0,2235
	F_{IS}	0,403	0,409	0,373	0,111	0,041
<i>Mfur06</i>	N	15	21	28	12	14
	N_A	15	17	22	14	17
	A_R	10,384	10,265	10,667	10,339	10,833
	H_O	0,5333	0,6667	0,9286	0,6667	0,8571
	H_E	0,9563	0,9524	0,9565	0,9529	0,9603
	HWE	*0,0000	*0,0000	0,4736	0,0065	0,1869
	F_{IS}	0,451	0,305	0,03	0,31	0,111
<i>Mfur14</i>	N	25	28	30	9	13
	N_A	13	14	16	8	13
	A_R	8,604	8,327	8,745	7,062	9,386
	H_O	0,7200	0,7500	0,7667	0,7778	0,5385
	H_E	0,9200	0,9065	0,9096	0,8562	0,9354
	HWE	0,0013	0,0088	0,0939	0,3963	*0,0000

	F _{IS}	0,221	0,175	0,159	0,097	0,434
<i>Mfur25</i>	N	30	28	29	9	13
	N _A	26	21	22	13	14
	A _R	10,708	10,082	10,27	11,026	10,013
	H _O	0,8667	0,9643	0,9655	1,0000	1,0000
	H _E	0,9520	0,9429	0,9480	0,9673	0,9477
	HWE	0,1861	0,5110	0,4635	1,0000	1,0000
	F _{IS}	0,091	-0,023	-0,019	-0,036	-0,058
<i>Soc050</i>	N	31	27	27	9	15
	N _A	23	22	21	7	16
	A _R	9,739	9,634	9,458	6,399	9,711
	H _O	0,8710	0,8148	0,8889	0,6667	0,9333
	H _E	0,9344	0,9147	0,9252	0,7909	0,9333
	HWE	0,2261	0,1067	0,5922	0,1341	0,5692
	F _{IS}	0,069	0,111	0,04	0,165	0
<i>Soc085</i>	N	29	25	25	9	15
	N _A	18	24	22	12	13
	A _R	7,845	10,358	9,48	9,956	8,012
	H _O	0,7586	0,8800	0,8800	0,7778	0,8000
	H _E	0,8675	0,9437	0,9200	0,9346	0,8874
	HWE	0,4957	0,2991	0,4975	0,1492	0,2363
	F _{IS}	0,127	0,069	0,044	0,176	0,102
<i>Soc204</i>	N	24	20	29	9	15
	N _A	6	7	10	5	4
	A _R	4,478	4,783	4,981	4,333	3,387
	H _O	0,5417	0,6500	0,6207	0,5556	0,6000
	H _E	0,7199	0,7346	0,6461	0,6013	0,5586
	HWE	0,0320	0,2503	0,1924	1,0000	0,7743
	F _{IS}	0,252	0,118	0,04	0,08	-0,077
Média	N total	31	32	34	15	16
	N _A	16,0	17,1	19,7	10,7	13,2
	A _R	8,745	9,126	9,398	8,734	8,912
	H _O	0,6972	0,7679	0,8172	0,7544	0,8130
	H _E	0,8991	0,9092	0,9029	0,8741	0,8886
	F _{IS}	0,229	0,157	0,093	0,140	0,079

Estruturação Populacional e Migração

As análises indicaram ausência de estrutura populacional genética e alta conectividade para *U. canosai* entre todas as localidades avaliadas. Para cada par de localidades (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,005$), nenhum teste G exato de diferenciação populacional foi significativo (χ^2 de 13,7 a 29,1; gl = 16; p-valores $> 0,02$) e todos os valores de F_{ST} foram negativos e sem significância (p-valores $> 0,48$) (Tabela 6). A

AMOVA considerando os dois grupos regionais Sul e Sudeste resultou em variações negativas entre os grupos ($F_{CT} = -0,013$; p-valor = 1) e entre as localidades ($F_{SC} = -0,014$; p-valor = 0,98), com toda a variação encontrando-se dentro das localidades ($F_{ST} = -0,028$; p-valor = 1). A AMOVA sem agrupamentos teve resultado semelhante, com variações negativas entre as localidades e toda a variação encontrando-se dentro das localidades ($F_{ST} = -0,023$; p-valor = 1) (Tabela 7).

Tabela 6: Teste G exato de diferenciação populacional (p-valores, diagonal superior) e F_{ST} (diagonal inferior) entre localidades de amostragem de *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste. Nenhum valor foi significativo (correção de Bonferroni: $\alpha < 0,005$).

	Localidade	RJ	SP	RS	SCT	NEC
Brasil	Niterói (RJ)	—	0,256	0,621	0,212	0,040
	Ilhabela (SP)	-0,009	—	0,280	0,365	0,023
	Rio Grande (RS)	-0,037	-0,011	—	0,545	0,571
Argentina	San Clemente del Tuyú (SCT)	-0,072	-0,033	-0,032	—	0,275
	Necochea (NEC)	-0,025	-0,007	-0,001	-0,036	—

Tabela 7: Análise Molecular de Variância (AMOVA) comparando os dois grupos regionais Sul (RS+SCT+NEC) vs. Sudeste (RJ+SP) e todas as localidades de amostragem de *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste. Abreviações dos índices de fixação: *cluster* em relação ao total (F_{CT}), subpopulação em relação ao *cluster* (F_{SC}) e subpopulação em relação ao total (F_{ST}).

Grupo regional	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação (%)	Índice de Fixação	P-valor
Sul (RS+SCT+NEC) vs. Sudeste (RJ+SP)	Entre grupos	1	-3,29	Va = -0,029	-1,33	$F_{CT} = -0,013$	1,00
	Entre localidades, dentro dos grupos	3	2,17	Vb = -0,032	-1,46	$F_{SC} = -0,014$	0,98
	Dentro das localidades	251	563,00	Vc = 2,243	102,80	$F_{ST} = -0,028$	1,00
	Total	255	561,88	Vt = 2,182	100		
Nenhum grupo	Entre localidades	4	-1,12	Va = -0,051	-2,31	$F_{ST} = -0,023$	1,00
	Dentro das localidades	251	563,00	Vb = 2,243	102,31		
	Total	255	561,88	Vt = 2,192	100		

Os resultados do STRUCTURE também confirmaram ausência de estruturação populacional genética (Figura 3). Todos os indivíduos apresentaram a mesma probabilidade de pertencer a qualquer população simulada. Os maiores valores de $L(K)$ (média = -4688,0) foram encontrados para uma população $K = 1$. O método do ΔK não é capaz de identificar $K = 1$; contudo, foi encontrado $\Delta K \cong 1$ para $K = 2$ a 4 populações, indicando que é improvável a existência de mais de uma população. Foram estimadas altas taxas de migração entre todas as localidades. O número médio de imigrantes por geração (γ) foi similar entre localidades, variando de 11,14 (do Rio de Janeiro a Necochea, a maior distância geográfica) a 22,09 (de Ilhabela a Rio Grande), com uma média geral de 18,41 (Figura 4). Rio Grande foi a localidade com maior número médio de imigrantes.

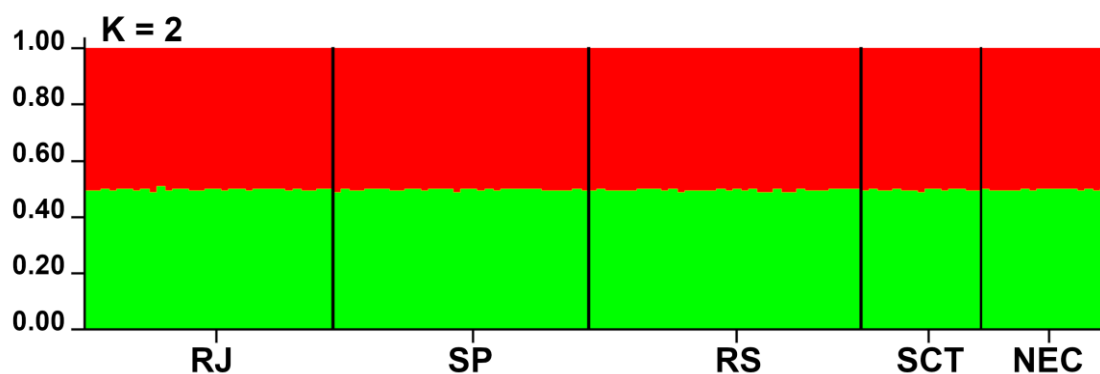


Figura 3: Simulação de duas populações ($K = 2$) para castanha *Umbrina canosai* no programa STRUCTURE. A linha quase contínua demonstra ausência de estrutura populacional genética. Localidades: Niterói (RJ), Ilhabela (SP), Rio Grande (RS), San Clemente del Tuyú (SCT) e Necochea (NEC).

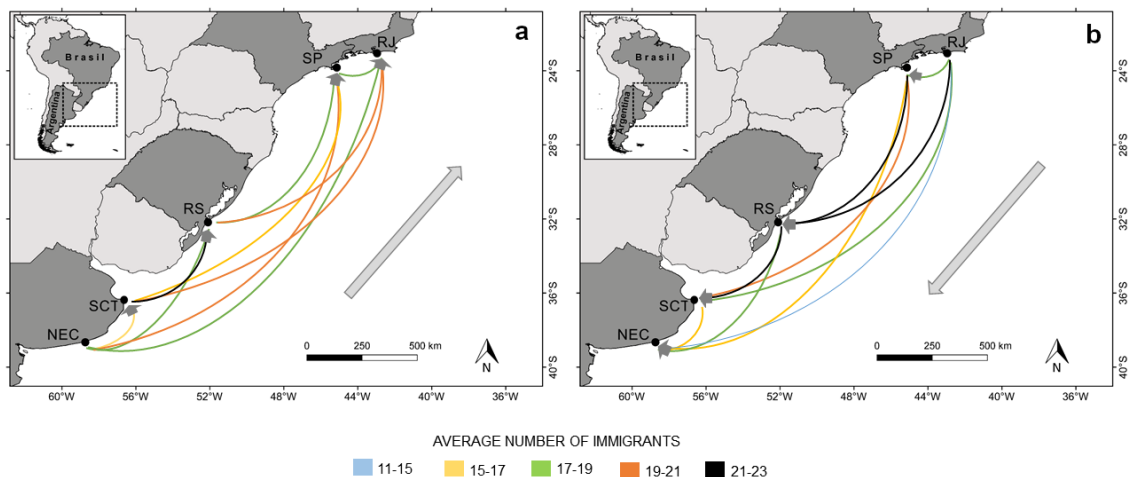


Figura 4: Estimativa do número médio de imigrantes por geração entre localidades: Niterói (RJ), Ilhabela (SP), Rio Grande (RS), San Clemente del Tuyú (SCT) e Necochea (NEC). (a) Migrações de sul para norte; (b) migrações de norte para sul. As setas cinzas indicam a imigração. As cores das linhas indicam a intensidade da migração (legenda).

Efeito Gargalo e Tamanho Populacional Efetivo

Não foram encontradas evidências para inferir evento de gargalo populacional para *U. canosai* no Atlântico Sudoeste (Tabela 8). Os testes de Wilcoxon para excesso de heterozigotos foram significativos somente sob o modelo mutacional de alelos infinitos, para RJ, SP e NEC, bem como quando todas as amostras foram avaliadas como uma única população (p -valores $< 0,05$). Contudo, nenhuma significância foi encontrada sob os modelos mutacionais passo a passo e de duas fases, considerados mais adequados para avaliação de microssatélites. Adotando a correção de Bonferroni, nenhum teste de Wilcoxon foi significativo ($\alpha < 0,0083$). Todas as localidades apresentaram o teste gráfico de frequência de alelos em forma de L, que é típico de populações estáveis. O valores M médios foram 0,637 para RJ; 0,696 para SP; 0,739 para RS; 0,494 para SCT; e 0,603 para NEC; quase todos em torno do valor crítico padrão $Mc = 0,68$. Quando se considerou a amostra como uma única população, o valor M foi de 0,873.

O programa COLONY estimou o tamanho populacional efetivo (N_e) de cada localidade em número de indivíduos considerando cruzamento aleatório e não-aleatório, que foram, respectivamente: 85 e 58 para RJ; 68 e 53 para SP; 83 e 70 para RS; 84 e 63 para SCT; 96 e 83 para NEC (Tabela 9). De maneira geral, o N_e foi similar entre as duas formas de cruzamento para todas as localidades, cada uma delas estando na faixa de 50 a 100 indivíduos.

Tabela 8: Testes de efeito gargalo para *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste: excesso de heterozigotos pelo teste de Wilcoxon (p-valores), sob três modelos mutacionais; valor M de Garza-Williamson (2001). As análises foram feitas para cada localidade e considerando todas as amostras como uma única população.

País	Localidade	Excesso de heterozigotos pelo Teste de Wilcoxon			Valor M
		Modelo alelos infinitos	Modelo de duas fases	Modelo passo a passo	
Brasil	Niterói (RJ)	0,020	0,527	0,770	0,637
	Ilhabela (SP)	0,037	0,473	0,770	0,696
	Rio Grande (RS)	0,320	0,680	0,844	0,739
Argentina	San Clemente del Tuyú (SCT)	0,680	0,844	0,980	0,494
	Necochea (NEC)	0,014	0,473	0,727	0,603
	Única população	0,020	0,809	0,980	0,873

Tabela 9: Tamanho populacional efetivo (N_e) estimado para *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste, por cada localidade e considerando cruzamentos aleatório e não-aleatório, com intervalos de confiança inferior (IC_{95}^-) e superior (IC_{95}^+). Intervalo superior infinito reflete limitação do método para tamanhos amostrais pequenos.

País	Localidade	Cruzamento aleatório			Cruzamento não-aleatório		
		N_e	IC_{95}^-	IC_{95}^+	N_e	IC_{95}^-	IC_{95}^+
Brasil	Niterói (RJ)	85	51	174	58	34	114
	Ilhabela (SP)	68	43	119	53	31	93
	Rio Grande (RS)	83	53	136	70	44	121
Argentina	San Clemente del Tuyú (SCT)	84	38	infinito	63	29	1398
	Necochea (NEC)	96	46	3021	83	39	910

DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou pela primeira vez as características genéticas populacionais da castanha *Umbrina canosai*, ao longo da maioria da sua distribuição geográfica no Atlântico Sudoeste. Para essa avaliação, foram utilizados oito *loci* microssatélites de espécies cofamiliares. Os *primers* desenvolvidos para *S. ocellatus* se demonstraram mais adequados para as análises de genética populacional de *U. canosai*, por apresentarem baixas frequências de alelos nulos e nenhum desvio de Hardy-Weinberg, em comparação com os *primers* desenvolvidos para *M. furnieri*. A presença de alelos nulos pode ser uma consequência do uso de microssatélites de outras espécies, o que reforça a importância de

se desenvolver *primers* espécie-específicos para estudos populacionais mais robustos. Alertamos também para a necessidade de implementar protocolos de PCR capazes de reduzir os picos tipo *stutter* e demais artefatos de PCR (e.g. Flores-Rentería & Krohn 2013).

Diversidade e estrutura populacional genética e rotas migratórias

A espécie apresentou diversidade genética elevada similar entre todas as localidades. Todas as análises realizadas mostraram ausência de estruturação populacional genética para *U. canosai* no Atlântico Sudoeste, com altas taxas de imigração, compondo uma população geneticamente homogênea ao longo de toda a área de ocorrência. Foi estimada uma faixa de 11 a 22 imigrantes médios por geração num fluxo de migração bidirecional, de sul para norte e de norte para sul. Laikre et al. (2005) discutem que, para algumas espécies de peixes, a homogeneidade genética pode prevalecer por amplas regiões geográficas, com alto fluxo gênico e sem isolamento reprodutivo. As taxas de imigração se demonstraram suficientes para não gerar diferenciação genética, podendo ser sustentadas tanto pelo deslocamento de peixes adultos, migrando ativamente, como pela dispersão de ovos e larvas.

A migração de animais em seu ambiente natural pode ser avaliada por diferentes abordagens. Neste estudo, a migração foi inferida a partir de características genéticas, em que são estimados os migrantes ao longo das gerações que efetivamente deixaram descendentes e contribuíram para o *pool* genético da região, geralmente um pequeno número de indivíduos (Beerli & Felsenstein 1999). Um baixo fluxo gênico já é suficiente para manter espécies conectadas. Por exemplo, um migrante por geração pode evitar a acumulação de diferenças genéticas fortes, enquanto dez migrantes por geração já são capazes de prevenir a maioria das diferenças na frequência alélica entre localidades (Slatkin 1987, Palumbi 2003). O uso de marcadores moleculares é uma importante ferramenta para avaliar o grau de conectividade de espécies marinhas em suas áreas de ocorrência, sobretudo quando há uma fase larval planctônica, com dispersão de difícil observação direta. A maioria das distâncias por dispersão larval é inferida indiretamente, com base na oceanografia da região, a biologia das larvas e características genéticas dos adultos (Palumbi 2003). Outra abordagem para acompanhar os deslocamentos de animais no oceano é a avaliação da migração instantânea através de rastreamentos via marcação e recaptura ou telemetria (Slatkin 1987, Laikre et al. 2005). Embora estas técnicas sejam

importantes para entender os movimentos dos indivíduos, elas não permitem inferir a estrutura populacional, pois o movimento entre populações nem sempre irá resultar em reprodução e consequente fluxo gênico (Laikre et al. 2005).

Migração e dispersão larval de longas distâncias já foram inferidas por microsatélites para diversas espécies. Como exemplo, Hoarau et al. (2002) encontraram homogeneidade genética e alto fluxo gênico para o linguado (*Pleuronectes platessa*) numa área com mais de 2000 km de linha de costa, na plataforma continental da França até a Noruega, incluindo a Grã-Bretanha. Os autores discutem que, apesar da filopatria descrita para esse linguado, alguns adultos podem estar migrando e se reproduzindo em localidades diferentes. Eles também revisam que a espécie apresenta alta mobilidade, com migrações comuns de 300 km a uma taxa de >20 km por dia, inesperada para peixes demersais; e fase larval longa (3 a 4 meses), que pode favorecer dispersões. Lacerda et al. (2016) sugerem que as correntes marinhas podem estar dispersando ovos e larvas do siri-azul (*Callinectes sapidus*) ao longo de ~740 km da costa do Rio Grande do Sul a Santa Catarina.

A área de distribuição de *U. canosai*, do Rio de Janeiro ao norte da Argentina, está dentro da Província Temperada Quente do Atlântico Sudoeste (Spalding et al. 2007). Ao longo dessa região, não existem barreiras geográficas evidentes com potencial para impedir o fluxo gênico (i.e. formações de terra), e há a influência de diferentes correntes marinhas que fluem para norte e sul. A costa do Atlântico Sudoeste é dominada por duas correntes oceânicas: a Corrente do Brasil, que transporta a Água Tropical quente e salina do nordeste do Brasil em direção ao sul; e a Corrente das Malvinas, um braço da Corrente Circumpolar Antártica, que transporta a Água Subantártica fria e menos salina em direção ao norte (Matano et al. 2010). Quando essas duas correntes se encontram, formam a Confluência Brasil-Malvinas, que ocorre em diferentes latitudes de acordo com a estação do ano, sendo geralmente entre 30-35°S durante o verão e 40-46°S durante o inverno (Zavialov et al. 1998). A confluência dessas águas forma a Água Central do Atlântico Sul, que afunda para profundidades maiores que 200 m e retorna a superfície em pontos de ressurgência, como no Cabo de Santa Marta Grande (Acha et al. 2004, Matano et al. 2010). Na plataforma continental, essas correntes oceânicas sofrem diluição pelo aporte fluvial: a Corrente do Brasil dá origem à Água Subtropical de Plataforma, e a Corrente das Malvinas origina a Água Subantártica de Plataforma. Uma diluição substancial é provocada pelo Rio da Prata (36°S), entre Uruguai e Argentina, e pela Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul (32°S). O encontro dessas águas caracteriza a Frente Subtropical

de Plataforma, que é uma extensão da Confluência Brasil-Malvinas sobre a plataforma continental; sua posição também depende da sazonalidade (Piola et al. 2000).

Nesse meio dinâmico, as correntes marinhas determinam a forma como o ictioplâncton se dispersa, influenciando também nas rotas migratórias de peixes adultos (Palumbi 2003). A literatura não reporta estudos específicos sobre a distribuição de ovos e larvas de *U. canosai*, nem sobre o rastreamento dos adultos. Estudos com marcação para a espécie não são prováveis no futuro próximo pelo alto custo e por envolver diferentes países. Portanto, com base em nossos dados e informações disponíveis na literatura, nós discutimos a seguir quatro formas possíveis de manter o fluxo gênico de *U. canosai* ao longo da sua distribuição geográfica no Atlântico Sudoeste. Cabe destacar que estas quatro hipóteses não são excludentes.

1. Deriva de ovos e larvas do sul para o norte: Na porção sul da sua distribuição, *U. canosai* desova de forma parcelada, durante o inverno e a primavera, na plataforma continental do Rio Grande do Sul até o Cabo de Santa Marta Grande, em Santa Catarina (33°50' a 28°40'S) (Haimovici & Cousin 1989). A dispersão dos ovos e larvas no plâncton pode ser investigada por derivadores, dispositivos oceanográficos que flutuam com as correntes, registrando sua direção e características físicas. No Atlântico Sudoeste, derivadores identificaram que uma extensão da Corrente das Malvinas pode carrear a Água Subantártica de Plataforma do sul do Brasil (33°S) até a latitude de 22°S durante o outono e inverno, principalmente pela atuação de frentes frias (Campos et al. 1996, Stevenson et al. 1998). Essa corrente é capaz de levar a fauna planctônica (foraminíferos, ostrácodes e microbivalves) de águas frias e temperadas até a costa tropical do Rio de Janeiro durante esse período (Stevenson et al. 1998).

Os derivadores superficiais foram liberados em fevereiro (verão) na plataforma continental brasileira, em torno de 25°S, sendo inicialmente transportados ao sul. Entre abril e maio (outono), os derivadores inverteram o seu curso para o norte, prosseguindo também nos meses de inverno. A direção e a velocidade das trajetórias foram variáveis, mas resultaram em deslocamentos lineares de 300 a 500 km por mês (Campos et al. 1996, Stevenson et al. 1998), o que corresponde a aproximadamente 10 a 17 km por dia. Consequentemente, os ovos e larvas de *U. canosai* podem ser transportados ao norte por essa corrente fria e rica em nutrientes. Como a literatura não reporta o tempo entre a desova e a eclosão, nem a duração da fase larval de *U. canosai*, é possível apenas especular sobre uma potencial distância de dispersão, com base em dados de espécies

aparentadas. Ovos de cienídeos levam em média um dia para eclodir (comunicação pessoal, LA Sampaio e JH Muelbert) e a duração das larvas no plâncton varia conforme a espécie e a temperatura: por exemplo, larvas de miragaia crescem em média a 0,17 mm/dia (*Pogonias cromis*, Cowan et al. 1992) e duram 21 dias no plâncton a 26°C (*Pogonias courbina*, comunicação pessoal LA Sampaio). Já as larvas de corvina (*Micropogonias furnieri*) crescem em média 0,36 mm/dia a 24 °C (Albuquerque et al. 2009) e permanecem cerca de 12 dias no plâncton (Weiss 1981). Em princípio, é improvável que larvas desovadas ao sul do Cabo de Santa Marta Grande cheguem ao Rio de Janeiro (~900 km de linha de costa). No entanto, é possível que esses indivíduos, após fase larval, recrutem como adultos do Sudeste e integrem aos reprodutores da região em anos posteriores.

2. Deriva de ovos e larvas do norte para o sul: Existe pouca informação sobre a biologia e ciclo reprodutivo da espécie para o Sudeste do Brasil. Contudo, os índices gonadosomáticos médios das fêmeas amostradas em Ilhabela, no mês de setembro, e em Niterói, no mês de fevereiro, foram próximos aos valores médios mensais para o Rio Grande do Sul nos respectivos meses, região onde o ciclo reprodutivo já é bem descrito (Haimovici & Cousin 1989). Na Figura 2, é possível visualizar que os IGs das fêmeas de Ilhabela em setembro foram compatíveis com a época de maturação sexual, enquanto os IGs das fêmeas de Niterói em fevereiro foram associados ao período pós-desova (Figura 2). Isso sugere que as desovas de *U. canosai* no Sudeste aconteçam também no inverno e primavera, assim como no Sul do Brasil. Dessa forma, em teoria os ovos e larvas podem ser carregados ao sul pela Água Subtropical de Plataforma, sob a influência da Corrente do Brasil, e atingir a Frente Subtropical de Plataforma.

3. Migração de adultos do sul para o norte: *U. canosai* é capaz de realizar deslocamentos migratórios longos. Na época reprodutiva no sul da sua distribuição, é conhecido o trajeto desta espécie do norte da Argentina até o Cabo de Santa Marta Grande (Haimovici & Cousin 1989), com em torno de 1300 km de distância. Na Figura 4, é possível observar o alto fluxo gênico entre San Clemente del Tuyú e Rio Grande. Diferentes experimentos mostraram que peixes costeiros realizam em média trajetos de poucas dezenas de quilômetros (em períodos de ~200 dias a mais de um ano), como *Cynoscion nebulosus* (Iversen & Tabb 1962), *Pogonias cromis* (Murphy et al. 1998), *Argyrosomus japonicus* e *Pomadourys commersonnii* (revisado por Dunlop et al. 2013).

Porém, os mesmos trabalhos identificaram que uma pequena parcela de indivíduos dessas espécies podem alcançar distâncias maiores, de centenas a mais de mil quilômetros.

Desse modo, é possível que alguns reprodutores de *U. canosai* se desloquem da região Sul à região Sudeste do Brasil, uma rota migratória ainda não descrita para a espécie. Indivíduos que permanecem na costa do Rio Grande do Sul durante o verão poderiam migrar para o Sudeste durante o inverno, quando a extensão da Corrente das Malvinas é mais intensa (Campos et al. 1996). Ainda, a conectividade do Rio Grande do Sul a São Paulo e Rio de Janeiro não necessariamente é direta, podendo ocorrer ao longo de gerações migrando gradativamente ao norte, suportada por indivíduos em zonas intermediárias, como a costa de Santa Catarina e Paraná.

4. Migração de adultos do norte para o sul: Reprodutores também podem migrar no sentido oposto, do Sudeste para o Sul do Brasil. Durante o verão, parte dos indivíduos que reproduzem na costa do Rio Grande do Sul se desloca para áreas de alimentação na costa uruguaia e argentina (Haimovici & Cousin 1989). O deslocamento para áreas de alimentação mais meridionais também é possível para os exemplares do Sudeste, que poderiam integrar aos reprodutores do Sul. Esse trajeto poderia ser favorecido pela Corrente do Brasil, mais intensa no verão. Novamente, o deslocamento pode não ser direto, mas ao longo de gerações. Rio Grande foi a localidade com maior número de imigrantes (Figura 4) e pode se comportar como um ponto médio para migrações gradativas ao longo de gerações entre o Sudeste do Brasil e a Província de Buenos Aires.

Abordagens genotípica, ecológica e fenotípica para a estrutura populacional e manejo de *U. canosai*

Diferentes autores argumentam que a identificação de populações e estoques deve ser feita de forma multidisciplinar, aplicando técnicas ecológicas, fenotípicas e genotípicas (Begg & Waldman 1999, Begg et al. 1999). Enquanto os microsatélites apontaram uma única população geneticamente homogênea de *U. canosai*, estudos ecológicos e fenotípicos recentemente identificaram dois grupos – um do norte da Argentina ao sul do Brasil e a outro no Sudeste do Brasil. Microsatélites são marcadores moleculares neutros por se encontrarem em zonas não-codificantes do genoma, portanto refletem o cruzamento entre indivíduos por hereditariedade mendeliana, retratam os processos de deriva genética e fluxo gênico e não sofrem influência da seleção natural.

Em contraste, as técnicas de identificação populacional ecológicas e fenotípicas incluem fatores que são influenciados pelo ambiente.

Canel et al. (2019) identificaram que a fauna parasitária de *U. canosai* aumenta em abundância e diversidade ao longo do desenvolvimento do peixe, indicando que os indivíduos incorporam a assembleia de parasitas do local onde se desenvolvem. Dessa forma, a diferenciação entre os dois grupos, não observada com os microsatélites, pode ser apenas um resultado das diferenças ambientais entre as regiões. A plataforma continental ao sul do Cabo de Santa Marta Grande (28°S) é caracterizada por águas frias (variação sazonal de <10 a ~20°C) e menos salinas (< 34), sob a atuação da Água Subantártica de Plataforma. Ao norte do Cabo de Santa Marta Grande, a plataforma continental é caracterizada por águas quentes (variação sazonal de ~17 a ~27°C) e mais salinas (>34,5), sob a atuação da Água Subtropical de Plataforma (Piola et al. 2000).

Kikuchi et al. (no prelo) verificaram que *U. canosai* alcança maiores tamanhos no sul da sua distribuição, e atribuíram essa diferença às cadeias alimentares de cada região, tendo em vista que os indivíduos do sul se beneficiam da zona de alta produtividade primária e secundária decorrente da Confluência Brasil-Malvinas e da Frente Subtropical de Plataforma (Acha et al. 2004). A região Sudeste, o norte da distribuição de *U. canosai*, é influenciada pela ascensão da Água Central do Atlântico Sul, principalmente durante o verão na região do Cabo Frio (23°S) (Piola et al. 2000). As águas frias (podendo ser inferiores a 15°C) e ricas em nutrientes podem favorecer a produtividade pelágica, mas resultam em baixa produtividade bentônica (Gaeta & Brandini 2006). Ainda, conforme a regra da temperatura para animais ectotérmicos, a fisiologia dos peixes é influenciada pela temperatura (latitude), onde águas mais frias implicam em maiores tamanhos corporais (Atkinson 1994).

Por fim, as diferentes formas do otólito observadas para *U. canosai* refletem a plasticidade fenotípica dessa estrutura (Kikuchi et al. no prelo). As porções do otólito responsáveis pela audição (e.g. *sulcus acusticus*) variam menos e são mais ligadas à herança genética. Já a forma do otólito como um todo pode se desenvolver e variar conforme as características do ambiente (e.g. temperatura e salinidade) e a qualidade do alimento (Schulz-Mirbach et al. 2019). O otólito recebe estímulos do meio físico e sua forma e densidade influenciam na dinâmica do fluido interno onde está inserido, um processo que está diretamente relacionado a como o peixe escuta e se orienta (Schulz-Mirbach et al. 2019). Portanto, a fauna parasitária e características fenotípicas são

adquiridas ao longo do desenvolvimento dos peixes, de acordo com o ambiente onde se estabelecem.

Marcadores moleculares refletem mais a estruturação de populações para a conservação da espécie em si, em longo prazo, do que a manutenção de estoques exploráveis (Begg & Waldman 1999), identificando menos grupos em relação às abordagens ecológicas e fenotípicas (Waldmann 1999). Além disso, microsatélites retratam diferenciações ocorridas há 10 a 100 gerações (Selkoe & Toonen 2006), enquanto as técnicas ecológicas e fenotípicas refletem eventos mais recentes (Waldman 1999), portanto há fluxo gênico entre as regiões, mas a mistura de indivíduos não é intensa. Deve-se reforçar que a abordagem genotípica não pode ser utilizada categoricamente na delimitação de unidades de manejo, e outros fatores devem ser considerados para propostas de manejo, incluindo os dois estoques previamente descritos (Zaneti Prado & Vazzoler 1976, Canel et al. 2019, Kikuchi et al. no prelo).

Comparação com outras espécies costeiras e marcadores moleculares

No Atlântico Sudoeste, diversas espécies de crustáceos e peixes costeiros com fase larval planctônica, alguns também da família Sciaenidae, tiveram sua genética populacional investigada por microsatélites e pela região controle do DNA mitocondrial (D-loop). As maiores diferenciações genéticas são encontradas geralmente em organismos com ampla distribuição ao longo da costa atlântica da América do Sul. Restringindo-se à faixa do Rio de Janeiro ao norte da Argentina, área de distribuição de *U. canosai*, não há um padrão único de estruturação.

Assim como para *U. canosai*, Silva (2015) reportou homogeneidade genética e alta conectividade para o goete *Cynoscion jamaicensis* na costa sudeste-sul do Brasil, avaliando microsatélites e D-loop em conjunto, com diferenciação apenas na costa norte do Brasil. Lacerda et al. (2016) encontraram baixos valores de F_{ST} e alto número de migrantes para o siri-azul *Callinectes sapidus* por microsatélites na costa sul do Brasil, considerando apenas uma população para a região. Homogeneidade genética também foi reportada ao longo da costa sudeste-sul para o camarão-branco *Litopenaeus schmitti* (Maggioni et al. 2003) e o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Teodoro et al. 2020), avaliados por microsatélites e D-loop respectivamente. A conectividade genética de peixes do Rio Grande do Sul ao norte da Argentina foi observada para a pescadinha *Macrodon atricauda* (Rodrigues et al. 2014), para a miragaia *Pogonias courbina*

(Machado et al. 2020), ambas por meio da avaliação da região D-loop; e para tainha *Mugil liza* (Mai et al. 2014), inferida por microssatélites. A maioria dos autores acima sugere que esta conectividade é promovida pela ação de correntes marinhas e que a Confluência Brasil-Malvinas e a Frente Subtropical de Plataforma não representarem uma barreira para o fluxo gênico das espécies.

Entretanto, diferentes padrões de estruturação também foram identificados do Rio de Janeiro ao norte da Argentina. Para a tainha *Mugil liza* (Mai et al. 2014) e o peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Cortinhas et al. 2016), avaliados por microssatélites e D-loop, respectivamente, foi encontrada uma população no Rio de Janeiro independente de populações mais ao sul. A análise de D-loop da pescadinha *Macrodon atricauda* (Rodrigues et al. 2014) e do papa-terra *Menticirrhus americanus* (Freitas et al. 2017), e de microssatélites da corvina *Micropogonias furnieri* (Vasconcellos 2012), identificaram uma diferenciação populacional entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sugerindo a Convergência Brasil-Malvinas como barreira biogeográfica. Para *M. furnieri* também foi observada estruturação populacional entre a costa uruguaia e o estuário do Rio da Prata, tanto por avaliação de microssatélites (D'Anatro et al. 2011) como de D-loop (Pereira et al. 2009).

As feições oceanográficas podem se comportar como barreiras dinâmicas ou não, dependendo da estratégia de vida da espécie analisada (Acha et al. 2004). As frentes oceanográficas formadas pela Convergência Brasil-Malvinas, Frente Subtropical de Plataforma e a ressurgência da Água Central do Atlântico Sul no Cabo de Santa Marta Grande não foram suficientes para impedir o fluxo gênico de *U. canosai*. Peixes estuarino-dependentes tendem a apresentar estruturação populacional mais frequentemente, mesmo que fracas. São espécies que utilizam estuários nos estágios iniciais de vida como berçários para seu desenvolvimento – como é o caso da corvina, tainha, pescadinha, peixe-rei e papa-terra – ou durante todo seu ciclo de vida – como é o caso de alguns indivíduos de corvina (Vieira et al. 2010). A permanência em estuários e áreas adjacentes em parte do seu ciclo de vida por essas espécies pode resultar em restrições de fluxo gênico entre regiões distantes (Rodrigues et al. 2014, Cortinhas et al. 2016, Freitas et al. 2017). Já espécies estritamente marinhas, com boa capacidade natatória e que realizam migrações reprodutivas extensas, como *U. canosai*, podem apresentar maior conectividade genética pela ação das correntes marinhas.

A interpretação dos padrões de estruturação entre populações deve ser ponderada de acordo com a taxa de mutação de cada marcador molecular. A região controle do DNA

mitocondrial (D-loop) apresenta taxas de mutação mais lentas e representa as gerações do Pleistoceno que sofreram modificações da linha de costa das últimas glaciações (Antoniou & Magoulas 2014). Já os microssatélites têm taxas de mutação mais aceleradas e retratam uma demografia mais recente, de 10 a 100 gerações atrás (Selkoe & Toonen 2006). Tanto microssatélites como D-loop são marcadores genéticos neutros, e existem casos onde maiores estruturas populacionais são encontradas com marcadores não-neutros do DNA, que sofrem influência do ambiente e da seleção natural, refletindo divergências adaptativas (Marini & Bekkevold 2014). Por exemplo, populações de *M. furnieri* apresentaram estruturação mais intensa para o Atlântico Sudoeste quando foi avaliada por *loci* microssatélites neutros juntamente com comprimento de íntrons de genes com funções fisiológicas (e.g. hormônio do crescimento), como marcadores não-neutros (Vasconcellos et al. 2015). Para a costa chinesa, a corvina-amarela (*Larimichthys polyactis*) não apresentou diferenciação genética com microssatélites neutros, mas um *locus* microssatélite ligado ao gene do receptor do glutamato foi capaz de identificar estruturação (Liu et al. 2016).

Marcadores neutros são úteis para investigar o isolamento reprodutivo e o fluxo gênico, utilizados neste estudo. Sugerimos o uso de marcadores não-neutros para trabalhos futuros, que podem complementar a interpretação da biologia de *U. canosai* e de outras espécies. Nós não descartamos a possibilidade de haver uma diferenciação genética sutil ou em andamento para *U. canosai*, que possa ser identificada por outras técnicas, como polimorfismos de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphism* - SNPs) ou marcadores não-neutros mais conservados do DNA.

Efeito gargalo e tamanho populacional efetivo

O presente estudo não encontrou evidências consistentes de efeito gargalo e todas as localidades apresentaram alta diversidade genética. *U. canosai* tem sofrido intensa pressão pesqueira nas últimas décadas, com queda histórica na sua captura por unidade de esforço (CPUE) – medida indireta (*proxy*) da abundância – e risco de colapso da sua exploração pesqueira (Haimovici et al. 2006, Haimovici & Cardoso 2016). No entanto, a ausência de efeito gargalo sugere que o declínio demográfico não implicou na perda da diversidade genética. No Atlântico Sudoeste, o mesmo acontece com a corvina (D’Anatro et al. 2011) e a tainha (Mai et al. 2014), espécies também sobrexploradas.

Nem todas as espécies de peixes que sofreram declínio populacional apresentam efeito gargalo, pois o número de indivíduos remanescentes ainda é grande o suficiente para manter a diversidade genética (Pujolar et al. 2011), sobretudo para *U. canosai*, que apresenta alta fecundidade e maturação sexual aos dois anos de idade (Haimovici & Cousin 1989). Todavia, a ausência do efeito gargalo não exclui outros impactos sofridos pela espécie, como a remoção dos indivíduos maiores e mais fecundos, principalmente pelo arrasto de meia-água (Haimovici & Cardoso 2016). O alto fluxo gênico da espécie também pode ter influenciado nas análises de efeito gargalo (Luikart et al. 1998, Peery et al. 2012), uma vez que a recuperação da diversidade genética após um evento gargalo é mais rápida na presença de imigração (Kellet et al. 2001).

É necessário ressaltar que os métodos utilizados para as estimativas de efeito gargalo têm limitações: os modelos mutacionais nem sempre refletem a realidade e as simulações de cruzamento podem ser simplistas (Pujolar et al. 2011). Também requerem um maior número de *loci* e de indivíduos do que utilizados no presente trabalho para produzir estimativas acuradas. Por exemplo, os baixos valores *M* de Niterói, San Clemente del Tuyú e Necochea podem ter sido devido ao tamanho amostral pequeno. As análises do programa BOTTLENECK têm maior poder estatístico com ao menos 10 *loci* e 30 indivíduos por localidade (Piry et al. 1999). O valor *M* necessita de ao menos 7 *loci* e 25 indivíduos por localidade (Garza & Williamson 2001).

Apesar da alta diversidade e ausência de efeito gargalo, foram estimados baixos tamanhos populacionais efetivos, numa faixa de 50 a 100 indivíduos para cada localidade. Em geral, são esperados valores pequenos para o N_e , que é 10^3 a 10^5 vezes menor que censo (N_c), representando somente os indivíduos que reproduziram com sucesso e que a prole sobreviveu até o recrutamento. Este índice pode ser interpretado como um *proxy* do número de reprodutores (N_b), ou seja, uma minoria de indivíduos que repõe cada geração (Marini & Bekkevold 2014, Andreev et al. 2015).

Mesmo assim, é preciso ponderar que o N_e tende a ser subestimado pelo método do COLONY quando o N_e verdadeiro é grande, o tamanho amostral é pequeno e a informação dos marcadores é escassa. Para estimativas acuradas de N_e , é recomendado o uso de ao menos 20 *loci* para espécies poligâmicas (Wang 2009) e 50 indivíduos por localidade (Marini & Bekkevold 2014). Além disso, o COLONY pressupõe que a amostra pertença a uma única coorte para inferir as relações de irmãos e meios-irmãos entre os indivíduos. A fuga desse pressuposto pode ter influenciado as estimativas de N_e (Wang 2009). Mais estudos, considerando as limitações apontadas neste trabalho, são

necessários para estimar o tamanho populacional efetivo de *U. canosai* com maior acurácia, podendo explorar outros métodos, como dos programas LDNe (Waples & Do 2008) e ONeSAMP (Tallmon et al. 2008).

CONCLUSÕES

- 1) Dos doze *primers* de microssatélites testados de *M. furnieri* e *S. ocellatus*, oito foram adequados para análises de genética populacional de *U. canosai*: *Mfur02*, *Mfur03*, *Mfur06*, *Mfur14*, *Mfur25*, *Soc050*, *Soc085* e *Soc204*. Os marcadores *Mfur13* e *Soc049* não amplificaram para as amostras de *U. canosai* e os marcadores *Mfur19* e *Mfur26* apresentaram excesso de alelos nulos.
- 2) A espécie apresentou diversidade genética elevada e similar entre todas as localidades.
- 3) Todas as análises de diferenciação genética indicaram ausência de estruturação genética para *U. canosai* no Atlântico Sudoeste (hipótese inicial refutada), compondo uma população geneticamente homogênea.
- 4) A espécie apresenta alto fluxo gênico por toda a sua distribuição geográfica, com 11 a 22 imigrantes médios por geração em cada localidade. A conectividade pode estar sendo promovida tanto por migrantes adultos como por dispersão de ovos e larvas via correntes marinhas da plataforma continental.
- 5) Não foram identificadas evidências consistentes de efeito gargalo genético para *U. canosai*. A hipótese de que a pressão pesqueira estaria causando depleção da diversidade genética foi refutada.
- 6) Foram estimados tamanhos populacionais efetivos na faixa de 50 a 100 indivíduos por cada localidade, valor que representa os reprodutores que efetivamente contribuem para o *pool* genético. Como discutido, as estimativas podem ter sido subestimadas, e análises futuras devem focar em mais amostras e números de *loci*.
- 7) Para propostas de exploração e manejo, devem ser considerados os dois estoques identificados por análises ecológicas/fenotípicas – norte da Argentina ao Sul do Brasil e Sudeste do Brasil. Mesmo assim, este trabalho forneceu resultados genéticos importantes para a conservação da espécie, como identificação da diversidade genética, conectividade e avaliação do efeito gargalo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha EM, Mianzan HW, Guerrero RA, Favero M, Bava J (2004) Marine fronts at the continental shelves of austral South America: Physical and ecological processes. *J Mar Syst* 44:83–105.
- Alberto F (2009) MsatAllele-1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *J Hered* 100:394–397.
- Albuquerque CQ, Muelbert JH, Sampaio LAN (2009) Early developmental aspects and validation of daily growth increments in otoliths of *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae) larvae reared in laboratory. *Panam J Aquat Sci* 4:259–266.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693.
- Andreev V, Fokin M, Mogue N, Strelkov P (2015) Long-term persistence and evolutionary divergence of a marine fish population with a very small effective population size (Kildin cod *Gadus morhua kildinensis*). *Mar Biol* 162:979–992.
- Antoniou A, Magoulas A (2014) Application of mitochondrial DNA in stock identification. In: *Stock identification methods* (pp. 257-295). Academic Press.
- Arif IA, Khan HA, Shobrak M, Al Homaidan AA, Al Sadoon M, Al Farhan AH, Bahkali AH (2010). Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 259-265.
- Atkinson D (1994) Temperature and Organism Size—A Biological Law for Ectotherms? *Adv Ecol Res* 25:1–58.
- Beerli P (2004) Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. 827–836.
- Beerli P, Felsenstein J (1999) Maximum-Likelihood Estimation of Migration Rates and Effective Population Numbers in Two Populations Using a Coalescent Approach.
- Begg GA, Friedland KD, Pearce JB (1999) Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: An overview. *Fish Res* 43:1–8.
- Begg GA, Waldman JR (1999) An holistic approach to stock identification. *Fish Res* 43:35–44.
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463.

- Cadrin SX, Friedland KD, Waldman J (2014) Stock identification methods: applications in fishery science. In: Cadrin SX, Karr LA, Mariani S (eds) Stock identification methods: an overview, 2nd edn. Academic Press, Cambridge, pp 1–5
- Campos, EJD, Ikeda Y, Castro BM, Gaeta SA, Lorenzzetti JA, Stevenson MR (1996). Experiment studies circulation in the Western South Atlantic. Eos, Transactions American Geophysical Union, 77(27), 253-259.
- Canel D, Levy E, Soares IA, Braicovich PE, Haimovici M, Luque JL, Timi JT (2019) Stocks and migrations of the demersal fish *Umbrina canosai* (Sciaenidae) endemic from the subtropical and temperate Southwestern Atlantic revealed by its parasites. Fish Res 214:10–18.
- Carvalho GR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Rev Fish Biol Fish 4:326–350.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144:2001–2014.
- Cortinhas MC, Kersanach R, Proietti M, Dumont LFC, D’Incao F, Lacerda ALF, Prata PS, Matoso DA, Noleto RB, Ramsdorf W, Boni TA, Prioli AJ, Cestari MM (2016) Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. Estuar Coast Shelf Sci 178:148–157.
- Cousseau MB, Perrota RG (1998) Peces marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca. INIDEP, Mar del Plata, 163 pp.
- Cowan JH, Birdsong RS, Houde ED, Priest JS, Sharp WC, Mateja GB (1992) Enclosure experiments on survival and growth of black drum eggs and larvae in lower Chesapeake Bay. Estuaries 15:392–402.
- D’Anatro A, Pereira AN, Lessa EP (2011) Genetic structure of the white croaker, *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) along Uruguayan coasts: Contrasting marine, estuarine, and lacustrine populations. Environ Biol Fishes 91:407–420.
- Dunlop S, Mann B, van der Elst R (2013) A review of the Oceanographic Research Institute’s Cooperative Fish Tagging Project: 27 years down the line. African J Mar Sci 35:209–221.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4:359–361.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of program stopper form population genetics analyses under Linux and windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Flores-Rentería L, Krohn A (2013) Scoring microsatellite loci. *Methods Mol Biol* 1006:319–336.
- Freitas A dos S, da Silva R, Sampaio I, Schneider H (2017) The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. *Fish Res* 191:87–94.
- Gaeta SA, Brandini FP (2006) Produção primária do fitoplâncton na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). In Rossi-Wongtschowski CLDB, Madureira LS (eds), *O ambiente oceanográfico da plataforma continental e do talude na região sudeste-sul do Brasil*. EDUSP, São Paulo: 219–264.
- Garrido-Ramos MA (2017) Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*, 8(9), 230.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:305–318.
- Glaubitz JC (2004) CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol Notes* 4:309–310.
- Gonzalez Alberdi P, Nani A (1967) Contribución al conocimiento de la biología del pargo blanco *Umbrina canosai*, de la region de Mar del Plata. *CARPAS - Docum. Téc. Num.* 10: 1-36.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9. 3. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611.
- Gulland JA (1983) *Fish Stock Assessment: A Manual of Basic Methods*. Chichester: FAO/Wiley, 223 pp.
- Haimovici & Cousin (1989) Reproductive biology of the castanha *Umbrina canosai* (Pisces, Scianidae) in southern Brazil. 523–537.

- Haimovici M (ed.) (2007) A prospecção pesqueira e abundância de estoques marinhos no Brasil nas décadas de 1960 a 1990: Levantamento de dados e avaliação crítica. Programa Revizee: Levantamento de Dados Pretéritos. MMA, Brasília.
- Haimovici M, Absalonsen L, Velasco G, Miranda LW (2006) Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). In: Rossi-Wongtschowski CLDB, Ávila-da-Silva AO, Cergole MC (eds). Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração – II. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p 77–85.
- Haimovici M, Cardoso ELG (2016) Colapso do estoque de *Umbrina canosai* do sul do Brasil devido à introdução do arrasto-de-meia-água. Bol do Inst Pesca 42:258–267.
- Haimovici M, Martins AS, Costa PAS, Braga AC, Mincarone MM (2017) Distribuição e abundância do nécton demersal da plataforma e talude continental da Bacia de Campos. In: Curbelo-Fernandez MP, Braga, AC (eds). Comunidades Demersais e Bioconstrutores: caracterização ambiental regional da Bacia de Campos, Atlântico Sudoeste. Rio de Janeiro, Elsevier. Habitats, v. 4. p. 111-138.
- Haimovici M, Martins AS, Vieira PC (1996) Distribuição e abundância de teleósteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. Revista Brasileira de Biologia 56(1):27-50.
- Haimovici M, Reis EG (1984) Determinação de idade e crescimento da Castanha *Umbrina canosai*, (Pisces, Sciaenidae) do Sul do Brasil. Atlântica 7:25–46.
- Haimovici M, Teixeira RL, Arruda C (1989) Alimentação da castanha *Umbrina canosai* (Pisces: Scienidae) no sul do Brasil. Rev Bras Biol 49:511–522.
- Haimovici M, Wongtschowski CLDBR, Bernardes RA, Fischer LG, Vooren CM, Santos RA, Rodrigues AR, Santos S (2008) Prospecção pesqueira de espécies demersais com rede de arrasto-de-fundo na região Sudeste-Sul do Brasil. Série Documentos REVIZEE - Score Sul, IO-USP.
- Hoarau G, Rijnsdorp AD, Van Der Veer HW, Stam WT, Olsen JL (2002) Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: Microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. Mol Ecol 11:1165–1176.
- Iversen ES, Tabb DC (1962) Subpopulations Based on Growth and Tagging Studies of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in Florida. Copeia 1962:544.
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Mol Ecol Resour 10:551–555.

- Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P, Beaumont MA, Hochachka WM, Smith JN, Bruford MW (2001). Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1474), 1387-1394.
- Kikuchi E, Cardoso LG, Canel D, Timmi JT, Haimivici M (Prelo) Using growth rates and otolith shape to identify the population structure of *Umbrina canosai* (Sciaenidae) from the Southwestern Atlantic. *Marine Biology Research*.
- Lacerda ALF, Kersanach R, Cortinhas MCS, Prata PFS, Dumont LFC, Proietti MC, Maggioni R, D’Incao F (2016) High connectivity among blue crab (*Callinectes sapidus*) populations in the Western South Atlantic. *PLoS One* 11:1–14.
- Laikre L, Palm S, Ryman N (2005) Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. *Ambio* 34:111–119.
- Lischer HE, Excoffier L (2012). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298-299.
- Liu BJ, Zhang BD, Xue DX, Gao TX, Liu JX (2016) Population structure and adaptive divergence in a high gene flow marine fish: The small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*). *PLoS One* 11:1–16.
- Longhurst, A. R., & Pauly, D. (1987). *Ecology of tropical oceans* (No. 574.52636 L6).
- Lopes XM, Da Silva E, Bassoi M, Dos Santos RA, De Oliveira Santos MC (2012) Feeding habits of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from south-eastern Brazil: New items and a knowledge review. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 92:1723–1733.
- Lucena FM, Vaske T, Ellis JR, O’Brien CM (2000) Seasonal variation in the diets of bluefish, *Pomatomus saltatrix* (Pomatomidae) and striped weakfish, *Cynoscion guatucupa* (Sciaenidae) in southern Brazil: Implications of food partitioning. *Environ Biol Fishes* 57:423–434.
- Lucifora LO, García VB, Menni RC, Escalante AH (2006) Lucifora et al., 2006. Food habits, selectivity, and foraging modes of the school shark *Galeorhinus galeus*. *Marine Ecology Progress Series*, 315, 259-270. *Mar Ecol Prog Ser* 315:259–270.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247.

- Macedo-Soares LCP, Garcia CAE, Freire AS, Muelbert JH (2014) Large-scale ichthyoplankton and water mass distribution along the South Brazil shelf. *PLoS One* 9:1–14.
- Machado RC, da Silva Cortinhas MC, Proietti MC, Haimovici M (2020) Genetic connectivity of black drum (*Pogonias courbina*) stocks in the southwestern Atlantic Ocean. *Environ Biol Fishes* 103:913–926.
- Madesis P, Ganopoulos I, Tsaftaris A (2013) Microsatellites: evolution and contribution. In *Microsatellites* (pp. 1-13). Humana Press, Totowa, NJ.
- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Mol Ecol* 12:3213–3217.
- Mai ACG, Miño CI, Marins LFF, Monteiro-Neto C, Miranda L, Schwingel PR, Lemos VM, Gonzalez-Castro M, Castello JP, Vieira JP (2014) Microsatellite variation and genetic structuring in *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) populations from Argentina and Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci* 149:80–86.
- Mariani, S., & Bekkevold, D. (2014). The nuclear genome: neutral and adaptive markers in fisheries science. In *Stock identification methods* (pp. 297-327). Academic Press.
- Markoulatos P, Sifakas N, Moncany M (2002) Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 16:47–51.
- Matano RP, Palma ED, Piola AR (2010) The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean Sci* 6:983–995.
- Militelli MI, Macchi GJ, Rodrigues KA (2013) Comparative reproductive biology of Sciaenidae family species in the Río de la Plata and Buenos Aires Coastal Zone, Argentina. *J Mar Biol Assoc U.K* 93(2):413–423.
- Murphy MD, Adams DH, Tremain DM, Winner BL (1998) Direct validation of ages determined for adult black drum, *Pogonias cromis*, in east-central Florida, with notes on black drum migration. *Fish Bull* 96:382–387.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH (2016) *Fishes of the world*. 5ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13:146–158.
- Peery M, Kirby R, Reid BN, Stoelting R, Doucet-Bœer E, Robinson S, Vásquez-Carrillo C, Pauli JN, Palsboll PJ (2012) Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Mol Ecol* 21:3403–3418

- Pereira AN, Márquez A, Marin M, Marin Y (2009) Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *J Fish Biol* 75:321–331.
- Piola AR, Campos EJD, Möller OO, Charo M, Martinez C (2000) Subtropical shelf front off eastern South America. *J Geophys Res Ocean* 105:6565–6578.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502–503.
- Pujolar JM, Bevacqua D, Capoccioni F, Ciccotti E, de Leo GA, Zane L (2011) No apparent genetic bottleneck in the demographically declining European eel using molecular genetics and forward-time simulations. *Conserv Genet* 12:813–825.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Rodrigues R, Santos S, Haimovici M, Saint-Paul U, Sampaio I, Schneider H (2014) Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): A study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. *Mitochondrial DNA* 25:150–156.
- Saillant E, Cizdziel K, O'Malley KG, Turner TF, Pruett CL, Gold JR (2004) Microsatellite markers for red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Gulf of Mexico Science*, 22(1).
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234.
- Schulz-Mirbach T, Ladich F, Plath M, Heß M (2019) Enigmatic ear stones: what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biol Rev* 94:457–482.
- Secor DH (2014) The unit stock concept: bounded fish and fisheries. In *Stock Identification Methods* (pp. 7-28). Academic Press.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9(5): 615-629.
- Silva (2015) Filogeografia e estrutura populacional da pescada-goete *Cynoscion jamaicensis* (Sciaenidae - Perciformes) do Atlântico Sul ocidental utilizando abordagem multilocus. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Pará.

- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787–792.
- Smith PJ, Francis RICC, McVeagh M (1991) Loss of genetic diversity due to fishing pressure. *Fish Res* 10:309–316.
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A, Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CA, Robertson J (2007) Marine ecoregions of the world: A bioregionalization of coastal and shelf areas. *Bioscience* 57:573–583.
- Stevenson MR, Dias-Brito D, Stech JL, Kampel M (1998) How do cold water biota arrive in a tropical bay near Rio de Janeiro, Brazil? *Cont Shelf Res* 18:1595–1612.
- Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA (2008) ONe-SAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Mol Ecol Resour* 8:299–301.
- Tellechea JS, Fine ML, Norbis W (2017a) Passive acoustic monitoring, development of disturbance calls and differentiation of disturbance and advertisement calls in the Argentine croaker *Umbrina canosai* (Sciaenidae). *J Fish Biol* 90:1631–1643.
- Tellechea JS, Perez W, Olsson D, Lima M, Norbis W (2017b) Feeding habits of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*): Echolocation or passive listening? *Aquat Mamm* 43:430–438.
- Teodoro SSA, Silva MC, Proietti MC, Costa RC, Dumont LFC (2020) High genetic connectivity among pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967) groups along the south-southeastern coast of Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci* 232:106488.
- Torres-Florez JP, Johnson WE, Nery MF, Eizirik E, Oliveira-Miranda MA, Galetti PM (2018). The coming of age of conservation genetics in Latin America: what has been achieved and what needs to be done. *Conservation genetics*, 19(1), 1-15.
- Turner TF, Richardson LR, Gold JR (1998) Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mol Ecol* 7:1771–1773.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
- Vasconcellos AV (2012) Diferenciação molecular de estoques de corvinas (*Micropogonias furnieri*) na costa Atlântica da América do Sul. 215. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Vasconcellos AV de, Lima D, Bonhomme F, Vianna M, Solé-Cava AM (2015) Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: The whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Fish Res* 167:333–337.
- Vieira JP, Garcia AM, Moraes LE (2010) A assembléia de peixes. In: Selliger U, Odebrecht C (Org.). *O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações*. 1 ed. Rio Grande: FURG v. 1 p. 79-88
- Waldman, JR (1999). The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research*, 43(1-3), 237-246.
- Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G. (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*. 25:2165–2176.
- Wang J (2009) A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Mol Ecol* 18:2148–2164.
- Waples RS, Do C (2008) LDNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8:753–756.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* 15:1419–1439.
- Weiss G (1981) Ictioplancton del estuário de Lagoa dos Patos. Tesis de Doctorado Universidad Nacional de La Plata 164p.
- Zanella CM, Turchetto C, Palma-Silva C, Sperb-Ludwig F (2017) Microssatélites: Metodologias de identificação e análise. In: Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. (eds). *Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p 94-117.
- Zaneti Prado EM (1979) Bionomia e ciclo de vida de *Umbrina canosai* Berg, 1895. *Bolm. Inst. Oceanogr.* 28 (1):119-165. São Paulo
- Zaneti Prado EM, Vazzoler AEA (1976) Alguns aspectos do ciclo de vida de *Umbrina canosai* na região da plataforma continental brasileira entre Cabo Frio (lat 23º S) e Torres (lat 29º 21'S). *Resumos da 28ª Reunião Anual da Soc. Brasileira para o Progresso da Ciência*: 244pp.
- Zavialov PO, Ghisolfi RD, Garcia CA (1998) An inverse model for seasonal circulation over the southern Brazilian shelf: Near-surface velocity from the heat budget. *Journal of Physical Oceanography*, 28(4), 545-562.

APÊNDICE 1: Manuscrito submetido

Microsatellites reveal high genetic connectivity and no apparent bottleneck events for the Argentine croaker (*Umbrina canosai*) in the Southwestern Atlantic

Davi de Vasconcellos^{1*}; Ana Luzia de Figueiredo Lacerda²; Máira Carneiro Proietti^{1,2}; Manuel Haimovici^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica - Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil

²Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil

*corresponding author: davi.vasconcellos.m@gmail.com

ABSTRACT

Understanding the population genetics of marine species is key to the definition of conservation and management strategies. In this work, we used microsatellite markers to evaluate the genetic diversity and population structure of the Argentine croaker *Umbrina canosai*, and to evaluate the connectivity of the species throughout most of its geographic distribution. Putative bottleneck events and effective population size were also evaluated. This sciaenid fish is endemic to the Southwestern Atlantic (from 22°S to 41°30'S) and has been intensively exploited by industrial fisheries in the southern range of its distribution. Eight microsatellite loci developed for other sciaenids amplified for *U. canosai* and were suitable for population genetic analysis, conducted with 128 individuals from five locations along about 2400 km of coastline (from southeastern Brazil to northern Argentina). The analyses indicated high genetic diversity, a genetically homogeneous population, extensive gene flow and no evidence of a genetic bottleneck event. Each location receives from 11 to 22 migrants from other areas per generation, a connectivity that may be promoted by egg and larvae dispersal via ocean currents as well as adult migrations. The large production of planktonic eggs and larvae, along with its migratory and strictly marine habits, could keep the genetic connectivity observed for *U. canosai*. Despite being genetically connected among areas, in practical terms the two stocks identified by ecological/phenotypic analyses – north of Argentina to southern Brazil and southeastern Brazil – should be considered for management proposals.

KEYWORDS: genetic diversity, population structure, bottleneck event, effective population size, migration, marine fish.

INTRODUCTION

The identification of populations of marine species contributes to the understanding of their ecology and biogeography, in addition to being one of the central aspects in the sustainable management of fishery resources (Cadrin et al. 2014) and for the maintenance of ecosystem integrity (Torres-Florez et al. 2018). A population can be defined as a group of conspecific individuals that interact and reproduce with each other, maintaining a similar genetic pool (Waples & Gaggiotti 2006, Secor et al. 2014). The manner in which genetic variation is distributed within and between populations is known as genetic population structure, and can indicate the level of gene flow between locations (Laikre et al. 2005). Homogeneous units are considered in the exploration and management of fishery resources as unitary stocks (*sensu* Cadrin et al. 2014), which are defined based on phenotypic, ecological and/or genotypic criteria and correspond to management units (Begg & Waldman 1999). Identifying populations is important for fisheries resource management, since managing several populations as a single population can result in depletion of genetic variation (Laikre et al. 2005); such identification is commonly done using neutral molecular markers. Among several molecular markers, microsatellites stand out as a useful tool for studying the recent genetic diversity and structure of populations, as well as the connectivity between them (Selkoe & Toonen 2006).

The Argentine croaker (*Umbrina canosai*) is a demersal fish of the Sciaenidae family, endemic to the Southwestern Atlantic and distributed between Rio de Janeiro state in Brazil (22°S) and the Gulf of São Matias in Argentina (41°30'S) (Cousseau & Perrota 1998). The species reaches over 400 mm in total length, has slow growth, lives for over 20 years (Haimovici & Reis 1984) and feeds on benthic organisms, mainly crustaceans and polychaetes (Haimovici et al. 1989). The species is abundant in the austral summer on the continental shelf of northern Argentina, used mainly as a feeding area (Gonzalez Alberdi & Nani 1967). In the autumn, they migrate to the extreme south of Brazil (33°50' to 28°40'S), where reproduction occurs during winter and spring (Haimovici & Cousin 1989), with posterior development of juveniles (Haimovici et al. 1996). Spawning females are also observed at the coast of Uruguay and Argentina in late spring (Militelli et al. 2013), and some adults remain at the coast of Rio Grande do Sul state (south Brazil) in the summer, suggesting that there are possibly other migratory patterns for *U. canosai* (Kikuchi et al. in press).

Knowledge on the biology of the Argentine croaker at the north of its distribution (southeast Brazil) is limited to fisheries prospection data but the occurrence of juveniles indicates that *U. canosai* also reproduces in this region (Zaneti-Prado 1979, Haimovici et al. 2007, 2008, 2017). The existence of two *U. canosai* stocks – one from northern Argentina to southern Brazil and the other in southeast Brazil – was proposed by Zaneti Prado & Vazzoler (1976), and this hypothesis was maintained in later works (Haimovici & Cousin 1989, Haimovici et al. 2006, 2008). Recently, ecological and phenotypic assessments have corroborated this structure. Canel et al. (2019) found that individuals from northern Argentina and Rio Grande do Sul present a parasitic assembly distinct from individuals in Rio de Janeiro. Similarly, Kikuchi et al. (in press) identified that *U. canosai* from these two regions have different growth and shape of sagittal otoliths.

U. canosai is exploited by industrial fisheries throughout its distribution, with catches that reached a maximum of 26,700 tons in 1973 and have been decreasing since then (Haimovici et al. 2006). In addition to bottom and gillnet trawl fleets, in recent years midwater trawling has targeted spawning adults on the external shelf of southern Brazil. This additional pressure puts the species at risk to the collapse of the fishery in the southern portion of its distribution (Haimovici & Cardoso 2016), which may lead to losses in genetic diversity and, consequently, reduced adaptability to environmental changes (Smith et al. 1991). Molecular markers can assist in assessing the population decline of exploited species, identifying possible bottleneck events and estimating effective population sizes (N_e) (Marini & Bekkevold 2014).

In this work, we used microsatellite markers to identify the diversity, population structure and genetic connectivity of *U. canosai* throughout most of its distribution in the Southwest Atlantic, as well as to investigate a possible bottleneck effect and estimate effective population size at the region. In addition, specimens from Brazil had their gonads evaluated to associate its spawning and larval dispersion with genetic migration analyses. We tested the hypotheses that the species is divided into two populations – one from Argentina to south Brazil and the other in southeast Brazil – and that it suffered a genetic bottleneck caused by intense fishing pressure.

MATERIAL AND METHODS

Sampling, biological characterization and gonadosomatic index

Adult specimens of Argentine croakers, measuring from 225 to 436 mm total length, were collected from five locations along approximately 2400 km of the Southwestern Atlantic coast: Niterói (Rio de Janeiro state), Ilhabela (São Paulo state) and Rio Grande (Rio Grande do Sul state) in Brazil, and San Clemente del Tuyú and Necochea in the Province of Buenos Aires, Argentina (Figure 1). Samples were obtained from commercial trawl and gillnet fisheries between 2017 and 2019 (Table 1). For each specimen, sex, total length (mm) and total weight (g) were recorded. For specimens from Brazil, gonad weight (0.01 g precision) and qualitative macroscopic gonadal maturation stage were also registered, and the gonadosomatic index (GI) calculated for each individual following the equation $IG = 100 \times (W_G/W_T)$, where W_G is the weight of the gonad and W_T is the total weight of the individual (Haimovici & Cousin 1989). A subsample of each location was selected for molecular analysis (Table 1), with a 2 g piece of muscle collected from each individual and stored in absolute ethanol at -20 °C until DNA extraction.

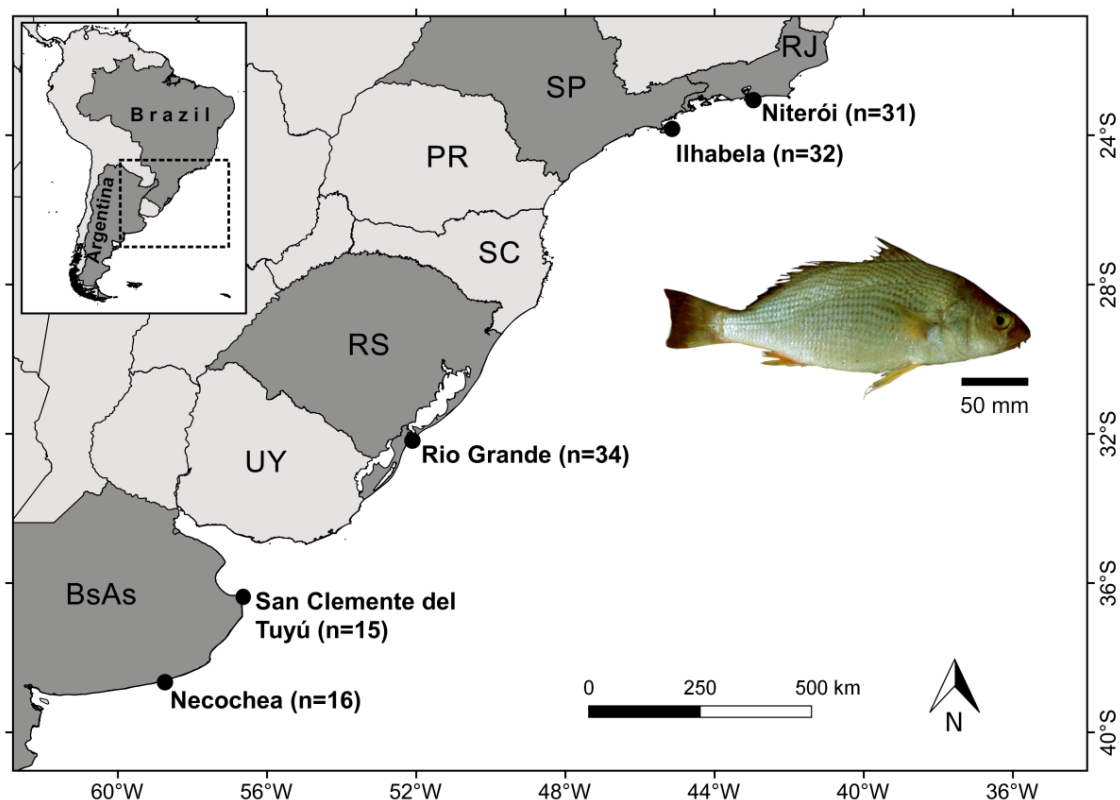


Fig 1: Sampling locations (indicated by dots) of Argentine croaker *Umbrina canosai* along its distribution range in the Southwestern Atlantic, at the Brazilian states of Rio

de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Rio Grande do Sul (RS), and in the Argentine province of Buenos Aires (dark grey). Other localities mentioned in the text: Brazilian states of Paraná (PR) and Santa Catarina (SC), and Uruguay (UY) (light grey).

DNA extraction, amplification and genotyping

The genomic DNA of each individual was extracted from muscle samples using the saline extraction method (Aljanabi & Martinez 1997). The concentration and purity of the DNAs were quantified with a BioDrop™ spectrophotometer (Biochrom™). DNA concentrations were standardized for 35 to 65 ng/μL (~50 ng/μL) by diluting in ultrapure water. Microsatellite loci were amplified via Polymerase Chain Reaction (PCR). Since specific primers for *Umbrina canosai* are not reported in literature, twelve primers from other species of Sciaenids were tested: 1) primers for eight microsatellite loci, developed for *Micropogonias furnieri* and polymorphic for *U. canosai*: Mfur02, Mfur03, Mfur06, Mfur13, Mfur14, Mfur19, Mfur25 and Mfur26 (Vasconcellos 2012); and 2) primers for four microsatellite loci, developed for the *Sciaenops ocellatus* (Turner et al. 1998) and polymorphic for *M. furnieri* (D'Anatro et al. 2011): Soc049, Soc050, Soc085 and Soc204.

PCRs were performed with M13 tails marked with fluorescences 6-FAM, HEX and NED (Table 2) in order to identify different loci during genotyping; fluorescences are incorporated into the fragment using forward M13 tailed forward primers (Schuelke 2000, Blacket et al. 2012). The reactions were carried out in a total volume of 20 μL, containing: 1 x buffer (Buffer), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.13 μM of the M13 tailed forward primer, 0.5 μM of the reverse primer, 0.25 μM of M13 tailed fluorescences, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and ~50 ng/μL of genomic DNA template, and completed with ultrapure water (Schuelke 2000, Vasconcellos et al. 2015). Most microsatellite markers were amplified separately (singleplex), but Mfur19 and Mfur25 were amplified simultaneously (multiplex) (Guichoux et al. 2011). Multiplex PCRs were performed with almost the same concentrations, but with 2x buffer (Markoulatos et al. 2002), both primer pairs and twice the concentration of fluorescence. For each PCR reaction, a sample without template DNA (negative control) was included, in order to detect possible contamination.

PCRs were performed in a Veriti™ 96-Well thermocycler (Applied Biosystems). Thermocycling conditions for the *M. furnieri* microsatellites were: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, primer annealing at 62 °C for 45 s, extension at 72 °C for 45 s; followed by eight cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, M13 tail annealing at 53 °C for 45 s, extension at 72 °C for 45 s; and a final extension at 72 °C for 30 min (Vasconcellos 2012, Vasconcellos et al. 2015).

Thermocycling conditions for the *S. ocellatus* microsatellites were: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 60-62 °C for 30 s, extension at 72 °C for 30 s; followed by eight cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, M13 tail annealing at 53 °C for 45 s, extension at 72 °C for 45 s; and a final extension at 72 °C for 30 min (D'Anatro et al. 2011). To verify amplifications, electrophoresis of PCR products was done on 1.8 - 2.0% agarose gels with a molecular weight marker and GelRed nucleic acid gel stain (0.001%), and visualized in a U.V. transilluminator. Of the tested primers, Mfur13 and Soc049 were discarded because they did not amplify the *U. canosai* samples analyzed in this study. To maximize the number of markers per genotyping reaction, we combined the PCR products amplified with different fluorescences in the same reaction (poolplex, Table 2) (Guichoux et al. 2011). PCR product concentration was estimated based on the molecular weight marker used in electrophoresis, and genotyping was done in an automated sequencer at Macrogen (South Korea, dna.macrogen.com).

Table 1: Origin and characterization of *Umbrina canosai* specimens from the Southwestern Atlantic used for molecular analyses, with the country, location, partner institution that provided the specimens, type of fishery, sampling period, depth (m), number of individuals (N), sex, total length (mm) and total weight (g) of individuals. Und. = undefined.

Country	Location	Sampling institution	Type of fishery	Period	Depth	N	Sex	Total length	Total weight
Brazil	Niterói (RJ)	Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)	Bottom trawl (industrial)	Feb/2019	80 - 120 m	31	15 ♀ 16 ♂	282 – 361 mm	250 – 542 g
	Ilhabela (SP)	Instituto de Pesca de São Paulo	Gillnets (artisanal)	Sep/2019	16 - 25 m	32	15 ♀ 17 ♂	250 – 303 mm	227 – 387 g
	Rio Grande (RS)	Universidade Federal do Rio Grande (FURG)	Bottom and midwater trawls and gillnets (industrial)	Aug and Sep/2018	18 - 105 m	34	18 ♀ 16 ♂	225 – 411 mm	144 – 982 g
Argentina	San Clemente del Tuyú (SCT)	Universidad Nacional Mar del Plata (UNMDP)	Bottom trawl (industrial)	Jan/2019	-	15	-	310 – 405 mm	388 – 824 g
	Necochea (NEC)			Apr/2017	-	16	10 ♀ 5 ♂ 1 und.	250 – 355 mm	238 – 528 g

Table 2: Sequences, repetition motifs, annealing temperature, allele size and total number of alleles of the microsatellite primers used for *Umbrina canosai*, with M13 tail underlined in the 5' region of each forward primer. To optimize genotyping, loci were combined in poolplex reactions according to the associated fluorescences.

Poolplex group	Locus	Primer sequences (5' - 3')	Repetitions	Fluorescence	Annealing temperature		Allele size (basepairs)		Total alleles in <i>U. canosai</i>	Original species
					Original	This study	Original species	<i>U. canosai</i>		
1	Mfur02	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCTTTGAGTTGGATGGATGAGC R: AGTGAGTTTAGAGGGTCTGC	(CA) ₂₁	HEX	50 °C	62 °C	194 - 296	218 - 284	30	Corvina, <i>Micropogonias furnieri</i> (Vasconcellos 2012)
	Mfur03	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCATGGAGCGATTAGGATGTGAAT R: CTGAAATGACTGAATGAGGCTG	(CA) ₁₉	FAM	50 °C	62 °C	240 - 336	226 - 286	26	
	Mfur06	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCC TTCACGTCTGTAGCTGTGTGTG R: GGAGACATCTGCCTGTTGAAG	(TG) ₁₄	NED	50 °C	62 °C	245 - 267	255 - 323	30	
	Mfur14	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCTCGTGATGTAGGGTGAAATCAG R: TGTGCGAGTGTGAGTTTGCT	(CA) ₂₂	FAM	50 °C	62 °C	244 - 284	238 - 280	20	
2	Mfur19 ^a	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCATTCAGGTTTTGAGTACCG R: TTGAACGACATGGTGCTAGG	(TG) ₂₀	HEX	50 °C	62 °C	302 - 332 ^b	278 - 354	28	
	Mfur25 ^a	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCCATGGCTGTCAAAGAAAAGGA R: TGCCTGTAAGCATCAGCAAC	(TG) ₂₂	HEX	50 °C	62 °C	150 - 220	146 - 228	34	
	Mfur26	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCGAGGATTTTATTGGCTCGCA R: GCCTGAGACGTGTTGACTGA	(GT) ₂₄	NED	60 °C	62 °C	264 - 326	264 - 280	8	
	Soc050	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCCCCGTGATTTTAGGCTCAGATA R: CCTTTAGAGTGCAGTAAGTGATTT	(GT) ₇	HEX	58 °C	62 °C	183 ^c	195 - 279	31	
3	Soc085	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCTTTGGACCTACACTAGAGTAGC R: CGTGGGAGACTAGCGATGTAGAT	(AC) ₁₇	FAM	58 °C	62 °C	80 - 122 ^c	114 - 186	35	
	Soc204	F: <u>TGTA</u> AAACGACGGCCACAGCAGTACCTGCCCAAACTG R: TCCCCTTCGTCTTCTCCACTTC	(CTG) ₁₂	NED	58 °C	60 °C	193 ^c	205 - 235	11	

^a *Mfur19* and *Mfur25* were amplified in *multiplex* reactions.

^b *Mfur19*: author did not report allele sizes of the original species; only the amplified sizes for *U. canosai* are shown.

^c *Soc050*, *Soc085* and *Soc204* were amplified in the original species without the M13 tail; therefore, original allele sizes are smaller than those in this study.

Data analysis

Genotype profiles were read on Peak Scanner™ 1.0 (Applied Biosystems). The true peaks (alleles) were visually differentiated from the stutter peaks and other types of artifacts, following the patterns described in the literature (eg, Selkoe & Toonen 2006 Appendix S2, Arif et al. 2010, Guichoux et al. 2011, Flores-Rentería & Krohn 2013). Allele classes were established in R version 4.0.2 (R Development Core Team, www.r-project.org) with the MsatAllele 1.05 package (Alberto 2009). Alleles were then checked visually to see if they followed the repetition motifs of each microsatellite (di- or trinucleotide).

None of the loci had data affected by stutter peaks or large allele dropout. However, all areas showed null alleles due to excess homozygotes, especially Niterói and Ilhabela (Table 4), and Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) was used to identify and adjust the genotypes of loci and locations that presented null alleles. The input files for each analysis were formatted using Convert 1.31 (Glaubitz 2004) and PGDSpider 2.1.1.5 (Lischer & Excoffier 2012). GenePop 4.7.5 (Raymond & Rousset 1995), FSTAT 2.9.4 (Goudet 2001) and Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) were used to calculate allele frequencies and genetic diversity indices: number of alleles (N_A), allelic richness (A_R), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E) and inbreeding coefficient (F_{IS}). Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were tested in GenePop using Markov Chains with 10,000 dememorization steps, 1,000 batches and 10,000 iterations per batch. Bonferroni's correction was used to adjust the level of significance in multiple tests: $\alpha_{Bonf.} = \alpha/k$, where $\alpha = 0.05$ and k = number of tests under the same null hypothesis (Rice 1989).

Genetic structure was investigated between pairs of localities by the exact G test of population differentiation in GenePop (with the same Markov Chain parameters described above) and by F_{ST} estimates in Arlequin. Two independent Molecular Analysis of Variance (AMOVA) were also conducted in Arlequin, each with 10,000 permutations: 1) comparison between the Southeast (RJ + SP) vs. South (RS + SCT + NEC) groups; 2) comparison among all locations. Additionally, Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) was used to assign individuals of similar genotypes to the most likely population. For this, 1 to 5 populations (K) were simulated, with 10 replicates each, using a Markov Chain with 100,000 burn-in steps, followed by 200,000 simulation steps. The most likely number of K populations was chosen by evaluating

three criteria: the probability of individuals belonging to each K population, the largest $L(K)$, and the largest ΔK , according to the Evanno method (Evanno et al. 2005), calculated in Structure Harvester 6.94 (Earl & von Holdt 2012). Migration between locations was estimated in Migrate 4.0 (Beerli & Felsenstein 1999), which employs a Bayesian approach based on the coalescence theory. This analysis was performed using the program's default settings and the Brownian motion model. The average number of migrants per generation (γ) between locations was calculated as $\gamma_{ab} = \theta_b \cdot M_{ab}$, where θ represents the mutation-scaled population size and M represents the mutation-scaled migration rate (Beerli 2004).

To verify if *U. canosai* suffered loss of genetic diversity due to recent population decline, three bottleneck methods were applied: first, excess heterozygosity was evaluated with the Wilcoxon test (more adequate for datasets with less than 20 loci), performed with 10,000 iterations in Bottleneck 1.2.02 (Piry et al. 1999). This test compares the expected heterozygosity under the Hardy-Weinberg Equilibrium (H_E) with the expected heterozygosity under the mutation-drift equilibrium (H_{EQ}), and a bottleneck effect is inferred when there is a significant excess of heterozygosity $H_E > H_{EQ}$ (Luikart & Cornuet 1998). H_{EQ} was calculated under the infinite alleles model, stepwise mutation model and two-phase model. The two-phase model parameters were chosen following Peery et al. (2012): variance of mutations with more than one repetition $\sigma_g^2 = 12$ (corresponding to mean $\delta_g = 3.1$) and 78% of mutations with one repetition (22% with more than one repetition). The second method was the graphical test of rare allele deficit, also calculated in Bottleneck, under the previously described conditions. For stable populations, the frequency distribution of alleles is expected to present an L-shaped histogram. When there is a bottleneck, rare alleles are lost and the distribution changes shape (Luikart et al. 1998). The third bottleneck evaluation method was the M ratio (Garza & Williamson 2001), calculated in Arlequin, which is the ratio between the number of alleles (N_A) and the microsatellite size range (r) in terms of number of repetitions. A bottleneck effect is assumed for populations with $M < 0.68$ (Garza & Williamson 2001). Effective population size (N_e) was estimated using the sibship assignment method in Colony 2.0.6.5 (Jones & Wang 2010), considering *U. canosai* to be polygamous and maintaining the software's default settings.

RESULTS

Gonadosomatic indexes

The mean gonadosomatic indexes per location in Brazil, for female and male *U. canosai*, were respectively: 1.66 and 1.21 in Niterói (February); 3.18 and 1.68 in Ilhabela (September); 2.33 and 1.80 in Rio Grande (August); 4.90 and 3.97 in Rio Grande (September) (Table 3). In Ilhabela and Rio Grande, maturation and advanced maturation gonads were more frequent. In Niterói, there was higher frequency of in recovery and spawned gonads. Figure 2 associates the mean gonadosomatic indexes obtained in this study from Niterói and Ilhabela, northern portion of the species distribution, with the values found by Haimovici & Cousin (1989), in the southern portion of the species distribution.

Table 3: Mean gonadosomatic indexes (GIs) of female and male *Umbrina canosai* per location along the Brazilian coast in the Southwestern Atlantic, with sample size (N), standard deviation (SD) and lower (CI₉₅ -)/upper (CI₉₅ +) confidence intervals.

		Mean	N	SD	IC ₉₅ -	IC ₉₅ +
Niterói (February)	Females	1.66	27	0.58	1.43	1.88
	Males	1.21	70	0.55	1.08	1.34
Ilhabela (September)	Females	3.18	43	0.96	2.89	3.46
	Males	1.68	79	1.68	1.31	2.05
Rio Grande (August)	Females	2.33	26	2.37	1.42	3.24
	Males	1.80	20	1.34	1.21	2.39
Rio Grande (September)	Females	4.90	26	1.94	4.15	5.64
	Males	3.97	15	2.60	2.66	5.29

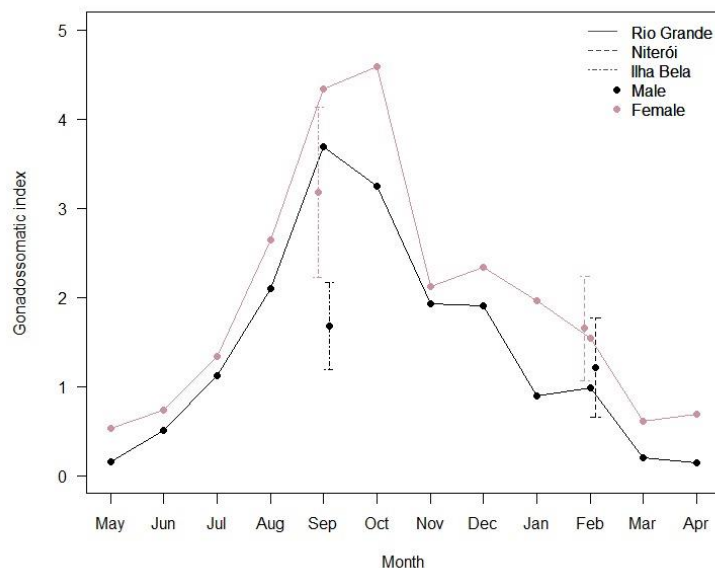


Fig 2: Mean gonadosomatic indexes (GIs) of female and male *Umbrina canosai* chestnut throughout the year. Points with continuous lines: Rio Grande, data by Haimovici & Cousin (1989). Points with dashed error bars (standard deviation): Niterói and Ilhabela, data from this work. The IGs of the females of Ilhabela in September were compatible with the time of sexual maturation, while the IGs of the females of Niterói in February were associated with the post-spawning period.

Marker validation

The genotypes of 128 individuals from the five locations were used. The ten genotyped loci were polymorphic, with a total of 253 alleles (genotypes and its allele frequencies showed in Appendices of Supplementary Material). The markers were validated according to the frequency of null alleles (Table 4), deviations from HWE (Table 5) and linkage disequilibrium. The highest frequencies of null alleles were found for markers Mfur26 (mean 0.331) and Mfur19 (mean 0.207); due to this, they also presented inflated inbreeding coefficients (Mfur26, mean F_{IS} 0.550; Mfur19, mean F_{IS} 0.367), and these were excluded from all subsequent analyses. Mfur02, Mfur03, Mfur06, Mfur14 and Soc204 presented null alleles for some locations, with the mean estimated frequencies close to or below 0.10. Some deviations from HWE were observed even after adjusting the genotypes: Mfur02 in RJ; Mfur03 in SP and RS; Mfur06 in RJ and SP; Mfur14 in NEC (Bonferroni correction: $\alpha < 0.001$). Mfur25, Soc050 and Soc085 did not show significant null alleles or deviation from HWE. Therefore, eight loci were maintained, considered independent because they did not

present linkage disequilibrium (Bonferroni correction: $\alpha < 0.0002$), and assuming that the analyses were not affected by their small deviations from HWE.

Table 4: Frequency of null alleles for each microsatellite locus in each location, estimated for *Umbrina canosai* in the Southwest Atlantic. Asterisks indicate significant null alleles; Mfur19 and Mfur26 were excluded from further analyses.

Locus	Niterói	Ilhabela	Rio Grande	San Clemente del Tuyú	Necochea	Mean
Mfur02	0.112*	0.036	0.034	0.096*	0.025	0.061
Mfur03	0.180*	0.207*	0.189*	0.014	-0.007	0.117
Mfur06	0.210*	0.141*	0.005	0.134*	0.038	0.106
Mfur14	0.161*	0.077	0.068*	-0.006	0.234*	0.107
Mfur19	0.330*	0.283*	0.134*	0.123*	0.166*	0.207
Mfur25	0.040	-0.023	-0.018	-0.048	-0.050	-0.020
Mfur26	0.364*	0.405*	0.382*	0.205*	0.299*	0.331
Soc050	0.027	0.051	0.012	0.080	-0.017	0.030
Soc085	0.056	0.025	0.015	0.066	0.031	0.038
Soc204	0.119	0.144*	0.021	-0.022	-0.103	0.032

Genetic diversity

Table 5 presents the genetic diversity indexes for the eight analyzed loci, in a total of 217 alleles. The trinucleotide Soc204 was the least diverse marker, with 11 alleles detected; the seven dinucleotide loci showed more than 20 alleles each, with a maximum of 35 alleles identified for Soc085. The allelic richness varied from 3.387 (Soc204 in NEC) to 11.026 (Mfur25 in SCT). Observed heterozygosity ranged from 0.533 (Mfur06 in RJ) to 1 (Mfur25 in SCT and NEC) and the expected heterozygosity ranged from 0.559 (Soc204 in NEC) to 0.967 (Mfur25 in SCT); the inbreeding coefficient ranged from -0.077 (Soc204 in NEC) to 0.451 (Mfur06 in RJ). H_O was higher in Rio Grande (average 0.817) and lower in Niterói (average 0.697), a location that also had the highest F_{IS} (average 0.229). A_R and H_E presented similar means among sampling locations. Total means for diversity indexes were: $A_R = 8.983$; $H_O = 0.770$; $H_E = 0.895$; and $F_{IS} = 0.140$.

Table 5: Genetic diversity of *Umbrina canosai* from the Southwestern Atlantic, evaluated by eight microsatellite loci. For each locus and each location, the number of genotypes used (N), number of alleles (N_A), allelic richness (A_R), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), likelihood of conformity to Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and inbreeding coefficient (F_{IS}). Asterisks (*) indicate significant deviations from HWE after Bonferroni's correction of $\alpha < 0.001$.

Locus	Index	Niterói (RJ)	Ilhabela (SP)	Rio Grande (RS)	San Clemente del Tuyú (SCT)	Necochea (NEC)
Mfur02	N	26	26	33	15	16
	N _A	17	16	25	16	17
	A _R	9.468	9.161	10.645	9.759	10.311
	H _O	0.7308	0.8462	0.8788	0.7333	0.8750
	H _E	0.9344	0.9269	0.9552	0.9333	0.9496
	HWE	*0.0006	0.5473	0.4410	0.0164	0.3782
	F _{IS}	0.221	0.089	0.081	0.22	0.081
Mfur03	N	9	14	23	7	10
	N _A	10	16	20	11	12
	A _R	8.732	10.396	10.936	11	9.643
	H _O	0.5556	0.5714	0.6087	0.8571	0.9000
	H _E	0.9085	0.9524	0.9623	0.9560	0.9368
	HWE	0.0034	*0.0001	*<0.0001	0.3337	0.2235
	F _{IS}	0.403	0.409	0.373	0.111	0.041
Mfur06	N	15	21	28	12	14
	N _A	15	17	22	14	17
	A _R	10.384	10.265	10.667	10.339	10.833
	H _O	0.5333	0.6667	0.9286	0.6667	0.8571
	H _E	0.9563	0.9524	0.9565	0.9529	0.9603
	HWE	*<0.0001	*<0.0001	0.4736	0.0065	0.1869
	F _{IS}	0.451	0.305	0.03	0.31	0.111
Mfur14	N	25	28	30	9	13
	N _A	13	14	16	8	13
	A _R	8.604	8.327	8.745	7.062	9.386
	H _O	0.7200	0.7500	0.7667	0.7778	0.5385
	H _E	0.9200	0.9065	0.9096	0.8562	0.9354
	HWE	0.0013	0.0088	0.0939	0.3963	*<0.0001
	F _{IS}	0.221	0.175	0.159	0.097	0.434
Mfur25	N	30	28	29	9	13
	N _A	26	21	22	13	14
	A _R	10.708	10.082	10.27	11.026	10.013
	H _O	0.8667	0.9643	0.9655	1.0000	1.0000
	H _E	0.9520	0.9429	0.9480	0.9673	0.9477
	HWE	0.1861	0.5110	0.4635	1.0000	1.0000
	F _{IS}	0.091	-0.023	-0.019	-0.036	-0.058
Soc050	N	31	27	27	9	15

	N _A	23	22	21	7	16
	A _R	9.739	9.634	9.458	6.399	9.711
	H _O	0.8710	0.8148	0.8889	0.6667	0.9333
	H _E	0.9344	0.9147	0.9252	0.7909	0.9333
	H _{WE}	0.2261	0.1067	0.5922	0.1341	0.5692
	F _{IS}	0.069	0.111	0.04	0.165	0
Soc085	N	29	25	25	9	15
	N _A	18	24	22	12	13
	A _R	7.845	10.358	9.48	9.956	8.012
	H _O	0.7586	0.8800	0.8800	0.7778	0.8000
	H _E	0.8675	0.9437	0.9200	0.9346	0.8874
	H _{WE}	0.4957	0.2991	0.4975	0.1492	0.2363
	F _{IS}	0.127	0.069	0.044	0.176	0.102
Soc204	N	24	20	29	9	15
	N _A	6	7	10	5	4
	A _R	4.478	4.783	4.981	4.333	3.387
	H _O	0.5417	0.6500	0.6207	0.5556	0.6000
	H _E	0.7199	0.7346	0.6461	0.6013	0.5586
	H _{WE}	0.0320	0.2503	0.1924	1.0000	0.7743
	F _{IS}	0.252	0.118	0.04	0.08	-0.077
N total		31	32	34	15	16
Mean	N _A	16.0	17.1	19.7	10.7	13.2
	A _R	8.745	9.126	9.398	8.734	8.912
	H _O	0.6972	0.7679	0.8172	0.7544	0.8130
	H _E	0.8991	0.9092	0.9029	0.8741	0.8886
	F _{IS}	0.229	0.157	0.093	0.140	0.079

Population structure and migration

The analyses indicated the absence of genetic population structure and high connectivity of *U. canosai* among all evaluated locations. None of the exact G tests of population differentiation between pair of localities were significant (χ^2 from 13.7 to 29.1; df = 16; p-values > 0.02) and all F_{ST} values were negative and non-significant (p-values > 0.48) (Bonferroni correction: α < 0.005) (Table 6). The AMOVA considering the two regional groups (South and Southeast) resulted in negative, non-significant variations between groups (F_{CT} = -0.013; p-value = 1) and localities (F_{SC} = -0.014; p-value = 0.98), with all variation being within the localities (F_{ST} = -0.028; p-value = 1). The ungrouped AMOVA also showed negative variations between locations, with all variation being observed within locations (F_{ST} = -0.023; p-value = 1) (Table 7).

Table 6: Exact G test of population differentiation (p-values, upper diagonal) and F_{ST} (lower diagonal) between *Umbrina canosai* sampling locations in the Southwestern Atlantic. No value was significant (Bonferroni correction: $\alpha < 0.005$).

Location	RJ	SP	RS	SCT	NEC
Niterói (RJ)	-	0.256	0.621	0.212	0.040
Ilhabela (SP)	-0.009	-	0.280	0.365	0.023
Rio Grande (RS)	-0.037	-0.011	-	0.545	0.571
San Clemente del Tuyú (SCT)	-0.072	-0.033	-0.032	-	0.275
Necochea (NEC)	-0.025	-0.007	-0.001	-0.036	-

Table 7: Analysis of Molecular Variance (AMOVA) comparing southern cluster (RS + SCT + NEC) vs. southeastern cluster (RJ + SP) and among all sampling locations of *U. canosai* in Southwestern Atlantic. Abbreviations of fixation indexes: cluster in relation to the total (F_{CT}), subpopulation in relation to the cluster (F_{SC}) and subpopulation in relation to the total (F_{ST}).

Group	Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage variation (%)	Fixation index	P-value
South (RS+SCT+NEC) vs. Southeast (RJ+SP)	Between groups	1	-3.29	Va = -0.029	-1.33	$F_{CT} = -0.013$	1.00
	Among locations, within group	3	2.17	Vb = -0.032	-1.46	$F_{SC} = -0.014$	0.98
	Within locations	251	563.00	Vc = 2.243	102.80	$F_{ST} = -0.028$	1.00
	Total	255	561.88	Vt = 2.182	100		
No group	Among locations	4	-1.12	Va = -0.051	-2.31	$F_{ST} = -0.023$	1.00
	Within locations	251	563.00	Vb = 2.243	102.31		
	Total	255	561.88	Vt = 2.192	100		

Results from Structure software also indicated lack of genetic population structure, with all individuals being equally likely to belong to any simulated population. The highest $L(K)$ values (mean = -4688.0) were found for $K = 1$ population. The ΔK method is not able to identify $K = 1$; however, a low $\Delta K \approx 1$ was found for $K = 2$ to 4 populations, indicating that the existence of more than one population is unlikely (Figure 3). Estimated migration rates were high, with mean number of migrants per generation being similar among locations and ranging from 11.14 (from Niterói to Necochea, largest geographical distance) to 22.09 (from Ilhabela to Rio Grande), with an overall mean of 18.41. Rio Grande was the location that received the highest number of migrants (Figure 4).

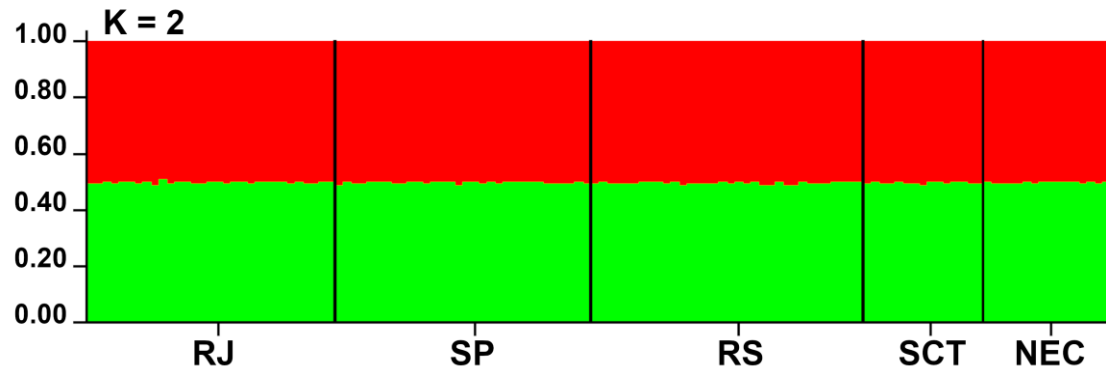


Fig 3: Structure simulation of two populations ($K = 2$) of *Umbrina canosai* in the Southwestern Atlantic. Sampling locations: Niterói (RJ), Ilhabela (SP), Rio Grande (RS), San Clemente del Tuyú (SCT) and Necochea (NEC).

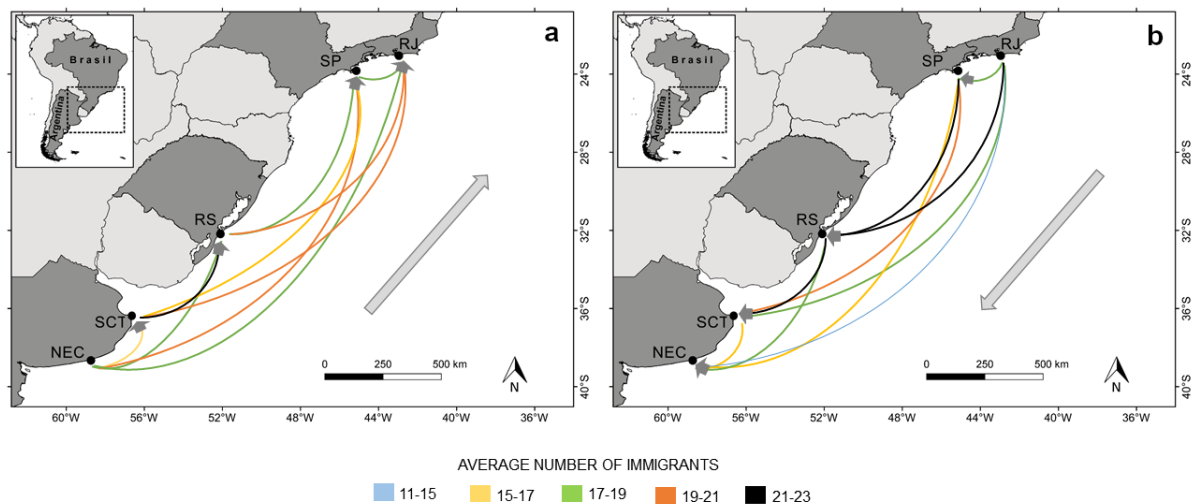


Fig 4: Mean number of immigrants per generation between locations: Niterói (RJ), Ilhabela (SP), Rio Grande (RS), San Clemente del Tuyú (SCT) and Necochea (NEC). **a** Migrations from south to north; **b** Migrations from north to south. Gray arrows indicate migration direction and line colors indicate the number of migrants.

Bottleneck effect and effective population size

The results do not indicate a population bottleneck for *U. canosai* in the Southwestern Atlantic (Table 8). Wilcoxon's tests for excess heterozygotes were significant for some locations (RJ, SP and NEC) under the infinite alleles mutation model, as well as when all samples were evaluated as a single population (p -values < 0.05). However, no significance was found with the step-by-step and two-phase models, considered more suitable microsatellites. After Bonferroni correction, all Wilcoxon tests

were non-significant ($\alpha < 0.0083$). For the graphical test of allele frequency, the five locations presented L-shaped distributions, which is an indication of stable populations. The average M ratios were 0.637 for RJ; 0.696 for SP; 0.739 for RS; 0.494 for SCT; and 0.603 for NEC; almost all around the standard critical value $M_c = 0.68$. When the samples were considered as a single population, the M ratio was 0.873. The effective population sizes (N_e) in number of individuals estimated with Colony software, considering random and non-random mating, were respectively: 85 and 58 for RJ; 68 and 53 for SP; 83 and 70 for RS; 84 and 63 for SCT; 96 and 83 for NEC (Table 9). In general, random and non-random mating led to similar N_e estimates, within the range of 50 to 100 individuals.

Table 8: Bottleneck effect tests for *Umbrina canosai* in the Southwestern Atlantic: Wilcoxon's test of excess heterozygotes (p-values), under three mutational models; Garza-Williamson M value (2001). Analyses were done separately for each location, and for all locations grouped into a single population.

Location	Wilcoxon's test of excess heterozygotes			M ratio
	Infinite alleles	Two-phase	Stepwise	
Niterói (RJ)	0.020	0.527	0.770	0.637
Ilhabela (SP)	0.037	0.473	0.770	0.696
Rio Grande (RS)	0.320	0.680	0.844	0.739
San Clemente del Tuyú (SCT)	0.680	0.844	0.980	0.494
Necochea (NEC)	0.014	0.473	0.727	0.603
Single population	0.020	0.809	0.980	0.873

Table 9: Estimated effective population size (N_e) for each *Umbrina canosai* sampling location in the Southwestern Atlantic, considering random and non-random mating, with lower (IC_{95}^-) and upper confidence intervals (IC_{95}^+).

Location	Random mating			Non-random mating		
	N_e	IC_{95}^-	IC_{95}^+	N_e	IC_{95}^-	IC_{95}^+
Niterói (RJ)	85	51	174	58	34	114
Ilhabela (SP)	68	43	119	53	31	93
Rio Grande (RS)	83	53	136	70	44	121
San Clemente del Tuyú (SCT)	84	38	∞^a	63	29	1398
Necochea (NEC)	96	46	3021	83	39	910

^a Infinite upper interval reflects the method limitation for small sample sizes.

DISCUSSION

This work evaluated, for the first time, the population genetic characteristics of the Argentine croaker *Umbrina canosai* throughout most of its distribution range in the Southwestern Atlantic. The primers previously developed for *S. ocellatus* were more suitable for *U. canosai* – as they presented low null allele frequencies and no deviation from HWE – than those developed for *M. furnieri*. The presence of null alleles may be a consequence of the use of microsatellites described for other species, which reinforces the importance of developing species-specific primers for more robust genetic evaluations.

Genetic diversity, structure and migrations

The species showed high and similar genetic diversity between locations. All analyses indicated an absence of genetic population structure for *U. canosai* in the Southwestern Atlantic, composing a genetically homogeneous population with no reproductive isolation. High migration rates were estimated in a bidirectional flow (north-south and vice-versa), with 11 to 22 average migrants per generation between each pair of locations. Although migration numbers appear be low, the estimated values represent migrants that actually generated offspring and contributed to the region's gene pool (Beerli & Felsenstein 1999), since a small amount of gene flow (1 to 10 migrants per generation) is already sufficient to maintain genetic similarity between locations, preventing strong differentiations (Slatkin 1987, Palumbi 2003). The use of molecular markers is an important tool to evaluate the degree of connectivity of marine animals, especially in species with high potential for dispersal (such as via planktonic larval phases) that lack tagging/tracking data, as is the case for *U. canosai*.

The distribution area of *U. canosai*, from Rio de Janeiro to northern Argentina, is within the Southwestern Atlantic Warm Temperate province (Spalding et al. 2007). Throughout this region, there are no obvious geographical barriers with the potential to stop gene flow (i.e. land barriers), and different marine currents – that flow to the north and south – could influence fish dispersal. The coast of the Southwestern Atlantic is dominated by two ocean currents: the Brazil Current, which transports warm and saline Tropical Water from northeast Brazil to the south; and the Malvinas Current, a branch of the Antarctic Circumpolar Current, which transports cold and less saline Sub-Antarctic Water to the north (Matano et al. 2010). The Brazil-Malvinas Confluence,

where these currents meet, occurs generally between 30-35°S during the summer and 40-46°S during the winter forming the South Atlantic Central Water, which sinks to depths over 200 m due to its higher density (Zavialov et al., 1998). On the continental shelf, this oceanic system is diluted by fluvial drainage systems, where the Brazil Current originates the Subtropical Shelf Water and Malvinas Current originates Subantarctic Shelf Water (Piola et al. 2000). The Subtropical Shelf Front is where these shelf waters meet, and its position also depends on seasonality, as an extension to the Brazil-Malvinas Confluence (Piola et al. 2000). In the following paragraphs, we discuss possible ways in which the gene flow of the species among southern and southeastern Brazil could be favored by these marine currents, which influence both the dispersal of fish larvae, as well as the movement routes of adult fish (Palumbi 2003).

Egg and larval dispersal

In the southern portion of its distribution, *U. canosai* spawns large number of eggs in baches along the winter and spring along the continental shelf from Rio Grande do Sul to Cabo de Santa Marta Grande, in Santa Catarina (33°50' to 28°40'S) (Haimovici & Cousin 1989). In the Southwestern Atlantic, surface drifters have shown that an extension of the Malvinas Current can carry Sub-Antarctic Shelf Water from southern Brazil (33°S) up to 22°S latitude during autumn and winter, mainly due to the action of cold fronts (Campos et al. 1996, Stevenson et al. 1998). This current is capable of carrying planktonic fauna (such as foraminifera, ostracods and microbivalves) from cold and temperate waters to the tropical coast of Rio de Janeiro during these seasons (Stevenson et al. 1998). The direction and speed of the trajectories were variable, but resulted in linear displacements of 300 to 500 km per month (Campos et al. 1996, Stevenson et al. 1998), which corresponds to approximately 10 to 17 km per day. Therefore, it is possible that *U. canosai* eggs and larvae can be transported to the north by this cold, nutrient-rich current.

There are no reports in literature of the time between spawning and hatching, nor the duration of the *U. canosai* larval phase, and it is possible only to speculate on a potential dispersal distance based on data from related species. Sciaenid eggs take an average of one day to hatch (personal communication, LA Sampaio and JH Muelbert) and the duration of the planktonic larval phase varies according to species and temperature: for example, black drum larvae grow on average 0.17 mm/day (*Pogonias*

cromis, Cowan et al. 1992) and remain planktonic for 21 days at 26°C (*Pogonias courbina*; personal communication LA Sampaio). Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) larvae grow on average 0.36 mm/day at 24°C (Albuquerque et al. 2009) and remain planktonic for about 12 days (Weiss 1981). It seems unlikely that larvae spawned south of Cabo de Santa Marta Grande will reach Rio de Janeiro (~900 km of coastline). However, it is possible that after the larval phase, these individuals from the south recruit as adults in the southeast and breed at the region.

There is little information on the biology and reproductive cycle of the species for southeastern Brazil. However, the average gonadosomatic indexes of females sampled in Ilhabela, in September, and in Niterói, in February, were close to the mean monthly values for Rio Grande do Sul, a region where the reproductive cycle is already well described (Haimovici & Cousin 1989). In Figure 2, it is possible to see that the GIs of females from Ilhabela in September were associated with sexual maturation, while the GIs of females from Niterói in February were associated with the post-spawning period. This suggests that *U. canosai* also spawns in the winter and spring in the southeast, as occurs in South Brazil. In this manner, the Subtropical Shelf Water, under the influence of the Brazil Current, could carry eggs and larvae southwards reaching the Subtropical Shelf Front.

Active adult migration

Adult *U. canosai* are capable of migrating in the reproductive season for as long as 1300 km between northern Argentina (38°S) and Cabo de Santa Marta Grande (28°40'S) (Haimovici & Cousin 1989). Indeed, the highest gene flow exchange was between San Clemente de Tuyú and Rio Grande (Figure 4). Different experiments have shown that many coastal marine fish travel on average a few tens of kilometers (in over 200 days to more than one year); examples include *Cynoscion nebulosus* (Iversen & Tabb 1962), *Pogonias cromis* (Murphy et al. 1998), *Argyrosomus japonicus* and *Pomadasys commersonnii* (reviewed by Dunlop et al 2013). However, the same studies identified that a few individuals of these species can move over larger distances, from hundreds to more than a thousand kilometers.

Considering this, it is possible that *U. canosai* breeders are exchanged between the South and Southeast regions of Brazil, leaving descendants in the areas where they migrate. Part of the individuals that breed at the coast of Rio Grande do Sul remain

there during the summer (Kikuchi et al. in press), and part migrate to feeding areas along the Uruguayan and Argentine coast (Haimovici & Cousin 1989). Eventually, some of the individuals that remain in Rio Grande do Sul could migrate to the Southeast during the winter, aided by the extension of the Malvinas Current (Campos et al. 1996). Individuals can also migrate in the opposite direction, from the Southeast to the South of Brazil, favored by the Brazil Current during the summer, reaching feeding areas more to the south and interacting with breeders.

Nevertheless, the connectivity between Rio Grande do Sul and areas more to the north is not necessarily direct, and could be occurring through gradual migrations over generations, supported by individuals in intermediate areas, such as specimens observed at the coast of Santa Catarina and Paraná. Rio Grande was the location with the highest number of migrants (Figure 4) and, on a larger scale, can behave as a midpoint for gradual migrations over generations between the both extremes of species distribution in Southeast Brazil and the Province of Buenos Aires.

Genotypic, ecological and phenotypic approaches to *U. canosai* population structure and management

Different authors argue that the identification of populations and stocks should be multidisciplinary, using ecological, phenotypic and genotypic information (Begg & Waldman 1999, Begg et al. 1999). While microsatellites pointed to a single genetically homogeneous population of *U. canosai*, ecological and phenotypic studies recently identified two groups – one from northern Argentina to southern Brazil and the other in southeastern Brazil. Microsatellites are neutral molecular markers, mostly located in non-coding regions of the genome; therefore, they reflect Mendelian heredity, portray the processes of genetic drift and gene flow and are not influenced by natural selection. In contrast, ecological and phenotypic population identification techniques include factors that are influenced by the environment.

Canel et al. (2019) identified that the parasitic fauna of *U. canosai* increases in abundance and diversity throughout fish development, indicating that individuals incorporate the assemblage of parasites from the habitat where they develop. Kikuchi et al. (in press) found that in Brazil *U. canosai* grow to larger sizes in the south of its distribution range, where they benefit from the high primary and secondary productivity zone resulting from the Brazil-Malvinas Confluence and the Subtropical Shelf Front

(Acha et al. 2004). Additionally, these authors observed different otolith forms for *U. canosai* from the South and Southeast regions, showing that some body structures present phenotypic plasticity. The parts of the otolith responsible for hearing (e.g. *sulcus acusticus*) vary less and are more linked to genetic inheritance; meanwhile, the shape of the otolith as a whole can develop and vary according to the environmental characteristics (e.g. temperature and salinity) and food quality (Schulz-Mirbach et al. 2019). Therefore, parasitic fauna and some phenotypic characteristics can be acquired throughout fish development according to the environment where they live.

Molecular markers tend to reflect the long-term conservation of the species and not the actual maintenance of exploitable stocks (Begg & Waldman 1999), identifying fewer groups when compared to ecological and phenotypic techniques (Waldman 1999). Furthermore, microsatellites, portray differentiation occurred 10 to 100 generations ago (Selkoe & Toonen 2006), while ecological and phenotypic techniques reflect more recent mating (Waldman 1999), therefore there is gene flow between regions, but the mixture of individuals is not intense. However, it should be reinforced that the genotypic approach cannot be categorically used in the delimitation of management units, and other factors should be considered in management plans, including the two previously described stocks (Zaneti Prado & Vazzoler 1976, Canel et al. 2019, Kikuchi et al. in press).

Comparison with other species and genetic markers

In the Southwestern Atlantic, several species of crustaceans and coastal fish, including some from the Sciaenidae family, with planktonic larval phases have had their population genetics investigated by microsatellites and the mitochondrial DNA control region (D-loop). As observed for *U. canosai*, a pattern of genetic homogeneity along the southeastern-southern coast of Brazil was inferred with microsatellites for the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Maggioni et al. 2003) and the blue crab *Callinectes sapidus* (Lacerda et al., 2016); with D-loop for the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Teodoro et al. 2020); and with both markers for the Jamaica weakfish *Cynoscion jamaicensis* (Silva, 2015). The genetic connectivity of fish from Rio Grande do Sul to northern Argentina has also been observed for the southern king weakfish *Macrodon atricauda* (Rodrigues et al. 2014) and the black drum *Pogonias courbina* (Machado et al. 2020), both using D-loop; and for the mullet *Mugil liza*, using

microsatellites (Mai et al. 2014). Most of the above-cited authors suggest that connectivity is likely promoted by dispersal via ocean currents.

Differently from the present study, some level of population genetic structure has been identified in the region for some species: (1) between Rio de Janeiro and southern populations for *M. liza* (microsatellites, Mai et al. 2014) and the silverside *Atherinella brasiliensis* (D-loop, Cortinhas et al. 2016); (2) between Santa Catarina and Rio Grande do Sul states for *M. atricauda* (D-loop, Rodrigues et al. 2014), the southern king croaker *Menticirrhus americanus* (D-loop, Freitas et al. 2017) and for *M. furnieri* (microsatellites; Vasconcellos 2012); and (3) between the Uruguayan coast and Rio de la Plata for *M. furnieri* (microsatellites, D'Anatro et al. 2011; D-loop, Pereira et al. 2009).

Oceanographic features can act as dynamic barriers, depending on the species' life strategy (Acha et al. 2004). Estuarine-dependent fish often present population structure, since they remain in estuaries and adjacent areas for part of their life cycle, resulting in restrictions to gene flow between distant areas (Rodrigues et al. 2014, Cortinhas et al. 2016, Freitas et al. 2017). Meanwhile, strictly marine species with large swimming capacity that carry out extensive reproductive migrations, such as *U. canosai*, have less restrictions to gene flow and may consequently present higher genetic connectivity. In fact, the oceanographic features formed by the Brazil-Malvinas Convergence, Subtropical Shelf Front and the South Atlantic Central Water upwelling in the Cape of Santa Marta Grande were not shown to prevent gene flow between *U. canosai* groups along the Southwestern Atlantic.

The interpretation of structuring patterns between populations of a species must consider the mutation rate of each genetic marker. The mitochondrial DNA D-loop region has slower mutation rates, and likely represents the Pleistocene generations that lived during extensive modifications of the coastline of the last glaciations (Antoniou & Magoulas 2014). Microsatellites, on the other hand, have faster mutation rates and portray a more recent history, from 10 to 100 generations ago (Selkoe & Toonen 2006). We do not rule out the possibility of a subtle or ongoing genetic differentiation for *U. canosai*, which can be identified by other techniques, such as single-nucleotide polymorphism (SNPs) or more conserved non-neutral DNA markers that reflect natural selection.

Bottleneck effect and effective population size

The present study did not find evidence of a bottleneck effect, and all sampled locations showed high genetic diversity. *U. canosai* has suffered intense fishery pressure, with a historical decrease in capture amounts and risk of fishery collapse (Haimovici et al. 2006, Haimovici & Cardoso 2016). The absence of a bottleneck effect suggests that the demographic decline did not lead to loss of genetic diversity. In the Southwest Atlantic, the same was observed for *M. furnieri* (D'Anatro et al. 2011) and *M. liza* (Mai et al. 2014), which are also overexploited species. Not all fish species that experience population declines present genetic bottlenecks: if the number of individuals remaining is still large enough to maintain genetic diversity (Pujolar et al. 2011). The high gene flow of the species may also influence genetic diversity (Luikart et al. 1998, Peery et al. 2012), since recovery of diversity after a bottleneck event is faster if there are migrations between areas (Keller et al. 2001). However, the absence of a bottleneck does not exclude other impacts on *U. canosai*, such as the removal of larger and more fertile individuals by trawling (Haimovici & Cardoso 2016). In any case, it is necessary to highlight the limitations of the bottleneck methods used, since mutational models do not always reflect reality, mating simulations can be simplistic (Pujolar et al. 2011) and the results depend on the number of individuals and loci analyzed (Piry et al. 1999, Garza & Williamson 2001). For example, the low M ratios observed for Niterói, San Clemente del Tuyú and Necochea may have been influenced by the small sample sizes of these areas.

Despite our observation of high diversity and no bottleneck, estimated effective population sizes were low, ranging from 50 to 100 individuals for each location. In general, small values are expected for N_e , which is around 10^3 to 10^5 smaller than the census size (N_c) and represents only individuals that successfully reproduced (Marini & Bekkevold 2014, Andreev et al. 2015); N_e can therefore be considered a *proxy* for the number of breeders of a population (N_b) (Wang 2009). N_e tends to be underestimated in Colony when the true N_e is large, the sample size is small and the information on the markers is scarce. In addition, Colony assumes that the sample belongs to a single cohort in order to infer on sibling and half-sibling relationships between individuals, and not conforming to this assumption may have influenced N_e estimates (Wang 2009). Further studies considering the limitations pointed out in this work are necessary to more accurately estimate the effective population size of *U. canosai*.

CONCLUSIONS

U. canosai composed a genetically homogeneous population with high gene flow throughout its geographic distribution, with between 11 and 22 immigrants per generation in each location. The strictly marine life strategy of *U. canosai* can also explain high gene flow, since there are few barriers to its migration. We believe connectivity may be favored by egg and larvae dispersal via ocean currents along the continental shelf, as well as by adult migrants. *U. canosai* showed no evidence of a genetic bottleneck, possibly because the number of individuals remaining even after intense fishing pressure was still large enough to maintain genetic diversity. Despite being genetically connected among areas, in practical terms the *U. canosai* fishery management is not shared throughout its distribution, with different countries having distinct legislation and management strategies. Therefore, for exploitation and management proposals, the two groups identified by ecological/phenotypic analyses – north of Argentina to southern Brazil and southeastern Brazil – must also be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M.C.d.S. Cortinhas, S. Teodoro, L. Medeiros, L.G. Cardoso, L. Rodrigues, M. Freire, R. Barutot, F. Abbatepaulo, C. Bosenbecker, J. Muelbert, L.A. de Sampaio and L.A.N. de Oliveira for their help in different stages of the work. We thank all partners in fish sampling: F. Vieira and F. Gonçalves from *Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro* (Brazil) for Niterói samples; L.V. de Miranda and A. Tomas from *Instituto de Pesca de São Paulo* (Brazil) for Ilhabela samples; J. Timi and D. Canel from *Universidad Nacional Mar del Plata* (Argentina) for Argentinean samples. This article is part of D.V.'s M.Sc. thesis in Biological Oceanography (PPGOB-FURG, Brazil), developed under the supervision of M.H. and M.C.P.

FUNDING

This study was financed by *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento* (CNPq - Brazil), which provided a scholarship to D.d.V. and a Research Fellowship to M.C.P. (PQ 312470/2018-5) and M.H. (PQ 307.994-2000-1). *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES - Brazil) provided access to the *Portal de Periódicos* and financial support through the *Programa de Excelência Acadêmica* – PROEX.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. Haimovici and M.C. Proietti contributed to the study conception and financing. Samples were obtained by D. de Vasconcellos and M. Haimovici. D. de Vasconcellos performed the laboratory and data analysis. D. de Vasconcellos and A.L.d.F. Lacerda contributed to the figures elaboration. M.C. Proietti translated to the English version. All authors interpreted the results, wrote the manuscript, revised it and approved its submission.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All animals used in this study were obtained by commercial fishery, therefore none ethical approval was need.

Artwork programs: QGIS, GIMP and Picasa.

REFERENCES

- Acha EM, Mianzan HW, Guerrero RA, Favero M, Bava J (2004) Marine fronts at the continental shelves of austral South America: Physical and ecological processes. *J Mar Syst* 44:83–105.
- Alberto F (2009) MsatAllele-1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *J Hered* 100:394–397.
- Albuquerque CQ, Muelbert JH, Sampaio LAN (2009) Early developmental aspects and validation of daily growth increments in otoliths of *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae) larvae reared in laboratory. *Panam J Aquat Sci* 4:259–266.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693.
- Andreev V, Fokin M, Mugue N, Strelkov P (2015) Long-term persistence and evolutionary divergence of a marine fish population with a very small effective population size (Kildin cod *Gadus morhua kildinensis*). *Mar Biol* 162:979–992.
- Antoniou A, Magoulas A (2014) Application of mitochondrial DNA in stock identification. In: *Stock identification methods* (pp. 257-295). Academic Press.

- Arif IA, Khan HA, Shobrak M, Al Homaidan AA, Al Sadoon M, Al Farhan AH, Bahkali AH (2010). Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 259-265.
- Beerli P (2004) Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. 827–836.
- Beerli P, Felsenstein J (1999) Maximum-Likelihood Estimation of Migration Rates and Effective Population Numbers in Two Populations Using a Coalescent Approach.
- Begg GA, Friedland KD, Pearce JB (1999) Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: An overview. *Fish Res* 43:1–8.
- Begg GA, Waldman JR (1999) An holistic approach to stock identification. *Fish Res* 43:35–44.
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463.
- Cadrin SX, Friedland KD, Waldman J (2014) Stock identification methods: applications in fishery science. In: Cadrin SX, Karr LA, Mariani S (eds) *Stock identification methods: an overview*, 2nd edn. Academic Press, Cambridge, pp 1–5
- Campos, EJD, Ikeda Y, Castro BM, Gaeta SA, Lorenzzetti JA, Stevenson MR (1996). Experiment studies circulation in the Western South Atlantic. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 77(27), 253-259.
- Canel D, Levy E, Soares IA, Braicovich PE, Haimovici M, Luque JL, Timi JT (2019) Stocks and migrations of the demersal fish *Umbrina canosai* (Sciaenidae) endemic from the subtropical and temperate Southwestern Atlantic revealed by its parasites. *Fish Res* 214:10–18.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014.
- Cortinhas MC, Kersanach R, Proietti M, Dumont LFC, D’Incao F, Lacerda ALF, Prata PS, Matoso DA, Noleto RB, Ramsdorf W, Boni TA, Prioli AJ, Cestari MM (2016) Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. *Estuar Coast Shelf Sci* 178:148–157.
- Cousseau MB, Perrota RG (1998) *Peces marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca*. INIDEP, Mar del Plata, 163 pp.

- Cowan JH, Birdsong RS, Houde ED, Priest JS, Sharp WC, Mateja GB (1992) Enclosure experiments on survival and growth of black drum eggs and larvae in lower Chesapeake Bay. *Estuaries* 15:392–402.
- D’Anatro A, Pereira AN, Lessa EP (2011) Genetic structure of the white croaker, *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) along Uruguayan coasts: Contrasting marine, estuarine, and lacustrine populations. *Environ Biol Fishes* 91:407–420.
- Dunlop S, Mann B, van der Elst R (2013) A review of the Oceanographic Research Institute’s Cooperative Fish Tagging Project: 27 years down the line. *African J Mar Sci* 35:209–221.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of program stopper form population genetics analyses under Linux and windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Flores-Rentería L, Krohn A (2013) Scoring microsatellite loci. *Methods Mol Biol* 1006:319–336.
- Freitas A dos S, da Silva R, Sampaio I, Schneider H (2017) The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. *Fish Res* 191:87–94.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:305–318.
- Glaubitz JC (2004) CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol Notes* 4:309–310.
- Gonzalez Alberdi P, Nani A (1967) Contribución al conocimiento de la biología del pargo blanco *Umbrina canosai*, de la region de Mar del Plata. *CARPAS - Docum. Téc. Num.* 10: 1-36.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9. 3. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611.
- Haimovici & Cousin (1989) Reproductive biology of the castanha *Umbrina canosai* (Pisces, Scianidae) in southern Brazil. 523–537.
- Haimovici M (ed.) (2007) A prospecção pesqueira e abundância de estoques marinhos no Brasil nas décadas de 1960 a 1990: Levantamento de dados e avaliação crítica. Programa Revizee: Levantamento de Dados Pretéritos. MMA, Brasília.
- Haimovici M, Absalonsen L, Velasco G, Miranda LW (2006) Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). In: Rossi-Wongtschowski CLDB, Ávila-da-Silva AO, Cergole MC (eds). *Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração – II*. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p 77–85.
- Haimovici M, Cardoso ELG (2016) Colapso do estoque de umbrina canosai do sul do Brasil devido à introdução do arrasto-de-meia-água. *Bol do Inst Pesca* 42:258–267.
- Haimovici M, Martins AS, Costa PAS, Braga AC, Mincarone MM (2017) Distribuição e abundância do nécton demersal da plataforma e talude continental da Bacia de Campos. In: Curbelo-Fernandez MP, Braga, AC (eds). *Comunidades Demersais e Bioconstrutores: caracterização ambiental regional da Bacia de Campos, Atlântico Sudoeste*. Rio de Janeiro, Elsevier. *Habitats*, v. 4. p. 111-138.
- Haimovici M, Martins AS, Vieira PC (1996) Distribuição e abundância de teleósteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 56(1):27-50.
- Haimovici M, Reis EG (1984) Determinação de idade e crescimento da Castanha *Umbrina Canosai*, (Pisces, Sciaenidae) do Sul do Brasil. *Atlântica* 7:25–46.
- Haimovici M, Teixeira RL, Arruda C (1989) Alimentação da castanha *Umbrina canosai* (Pisces: Scienidae) no sul do Brasil. *Rev Bras Biol* 49:511–522.
- Haimovici M, Wongtschowski CLDBR, Bernardes RA, Fischer LG, Vooren CM, Santos RA, Rodrigues AR, Santos S (2008) Prospecção pesqueira de espécies demersais com rede de arrasto-de-fundo na região Sudeste-Sul do Brasil. *Série Documentos REVIZEE - Score Sul*, IO-USP.
- Iversen ES, Tabb DC (1962) Subpopulations Based on Growth and Tagging Studies of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in Florida. *Copeia* 1962:544.

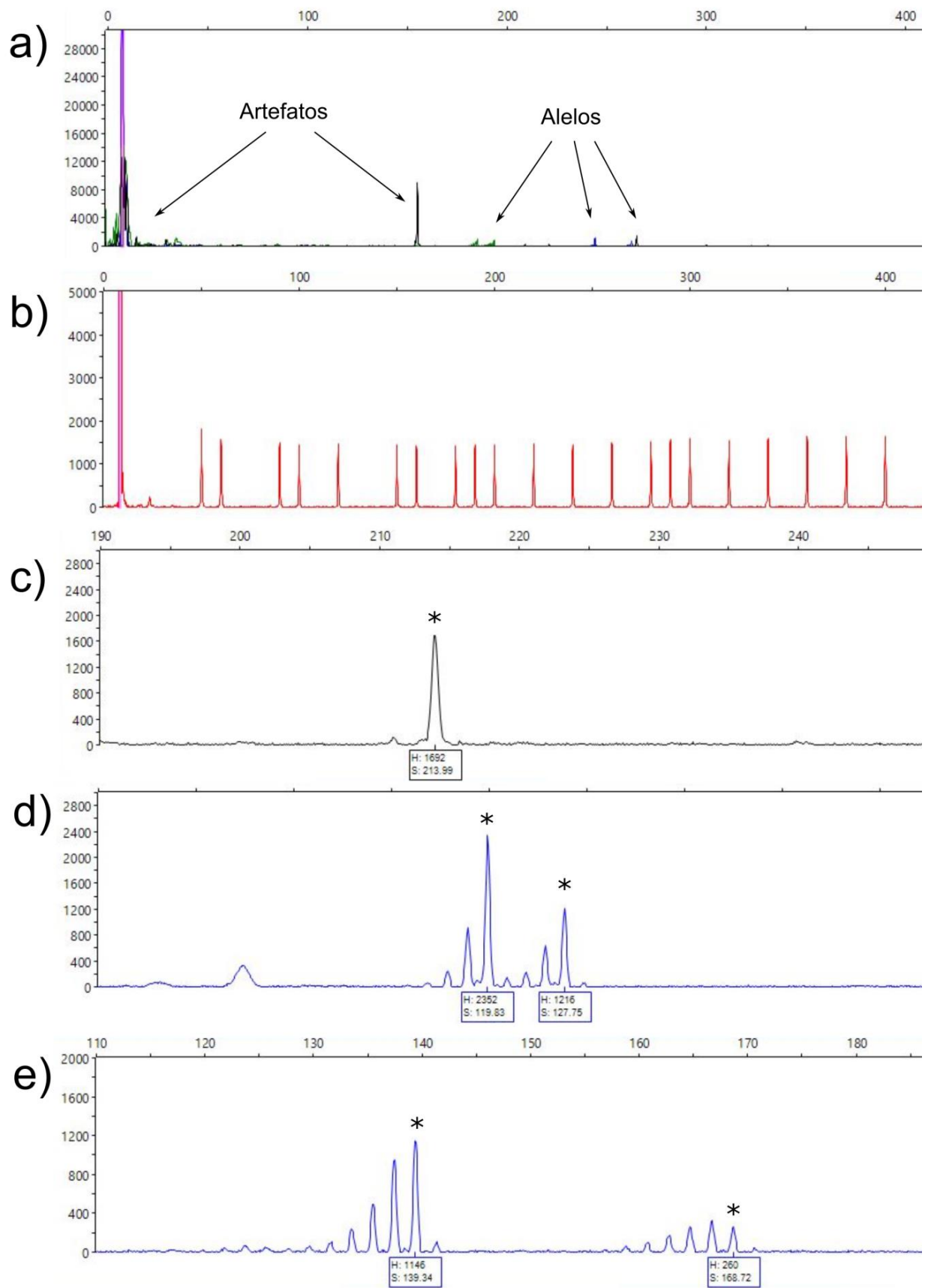
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Resour* 10:551–555.
- Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P, Beaumont MA, Hochachka WM, Smith JN, Bruford MW (2001). Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1474), 1387-1394.
- Lacerda ALF, Kersanach R, Cortinhas MCS, Prata PFS, Dumont LFC, Proietti MC, Maggioni R, D’Incao F (2016) High connectivity among blue crab (*Callinectes sapidus*) populations in the Western South Atlantic. *PLoS One* 11:1–14.
- Laikre L, Palm S, Ryman N (2005) Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. *Ambio* 34:111–119.
- Lischer HE, Excoffier L (2012). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298-299.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247.
- Machado RC, da Silva Cortinhas MC, Proietti MC, Haimovici M (2020) Genetic connectivity of black drum (*Pogonias courbina*) stocks in the southwestern Atlantic Ocean. *Environ Biol Fishes* 103:913–926.
- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Mol Ecol* 12:3213–3217.
- Mai ACG, Miño CI, Marins LFF, Monteiro-Neto C, Miranda L, Schwingel PR, Lemos VM, Gonzalez-Castro M, Castello JP, Vieira JP (2014) Microsatellite variation and genetic structuring in *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) populations from Argentina and Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci* 149:80–86.
- Mariani, S., & Bekkevold, D. (2014). The nuclear genome: neutral and adaptive markers in fisheries science. In *Stock identification methods* (pp. 297-327). Academic Press.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002) Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 16:47–51.
- Matano RP, Palma ED, Piola AR (2010) The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean Sci* 6:983–995.

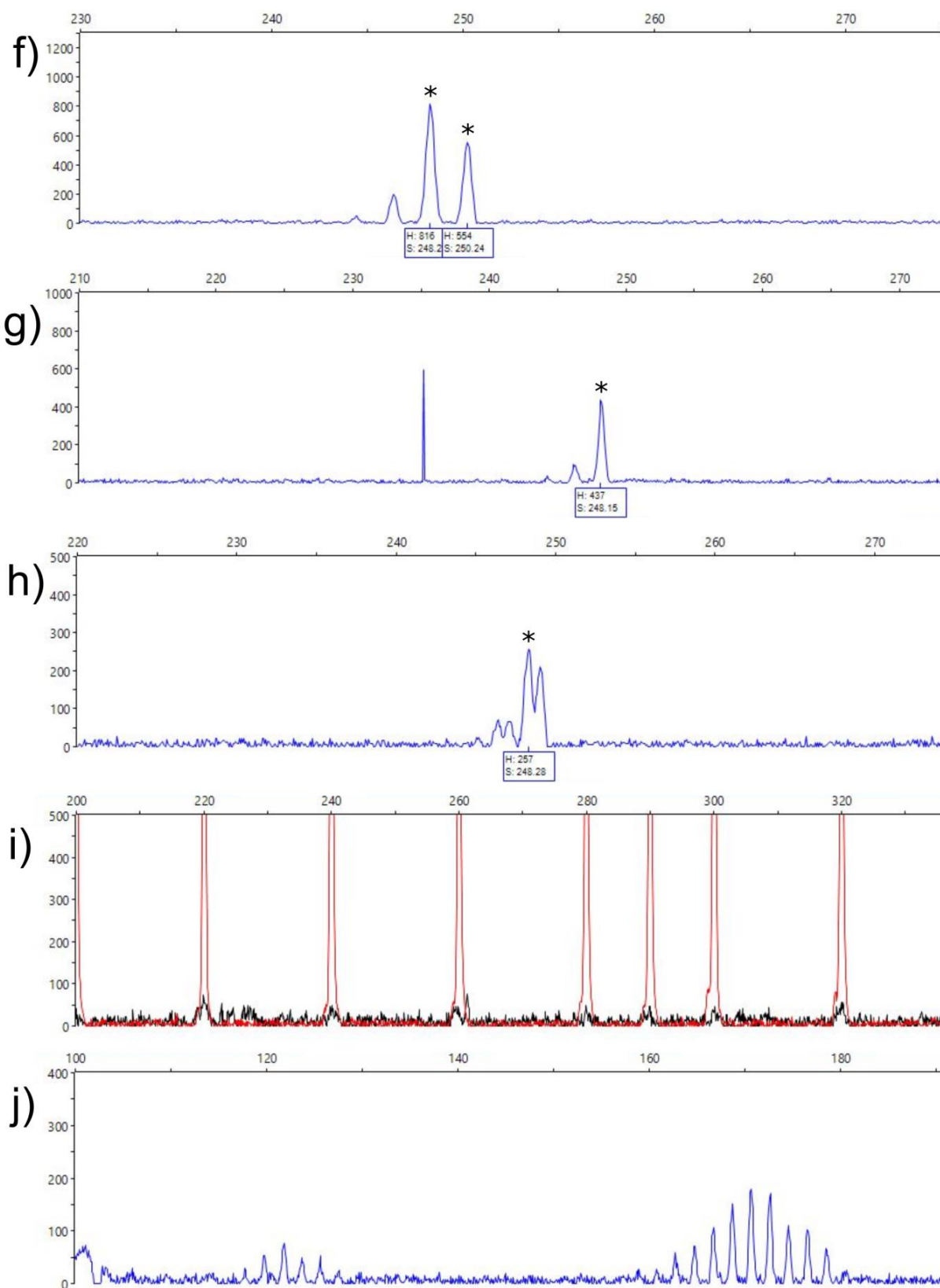
- Militelli MI, Macchi GJ, Rodrigues KA (2013) Comparative reproductive biology of Sciaenidae family species in the Río de la Plata and Buenos Aires Coastal Zone, Argentina. *J Mar Biol Assoc U.K* 93(2):413–423.
- Murphy MD, Adams DH, Tremain DM, Winner BL (1998) Direct validation of ages determined for adult black drum, *Pogonias cromis*, in east-central Florida, with notes on black drum migration. *Fish Bull* 96:382–387.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13:146–158.
- Peery M, Kirby R, Reid BN, Stoelting R, Doucet-Béer E, Robinson S, Vásquez-Carrillo C, Pauli JN, Palsboll PJ (2012) Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Mol Ecol* 21:3403–3418
- Pereira AN, Márquez A, Marin M, Marin Y (2009) Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *J Fish Biol* 75:321–331.
- Piola AR, Campos EJD, Möller OO, Charo M, Martinez C (2000) Subtropical shelf front off eastern South America. *J Geophys Res Ocean* 105:6565–6578.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502–503.
- Pujolar JM, Bevacqua D, Capoccioni F, Ciccotti E, de Leo GA, Zane L (2011) No apparent genetic bottleneck in the demographically declining European eel using molecular genetics and forward-time simulations. *Conserv Genet* 12:813–825.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Rodrigues R, Santos S, Haimovici M, Saint-Paul U, Sampaio I, Schneider H (2014) Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): A study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. *Mitochondrial DNA* 25:150–156.

- Saillant E, Cizdziel K, O'Malley KG, Turner TF, Pruett CL, Gold JR (2004) Microsatellite markers for red drum, *Sciaenops ocellatus*. Gulf of Mexico Science, 22(1).
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat Biotechnol 18:233–234.
- Schulz-Mirbach T, Ladich F, Plath M, Heß M (2019) Enigmatic ear stones: what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. Biol Rev 94:457–482.
- Secor DH (2014) The unit stock concept: bounded fish and fisheries. In Stock Identification Methods (pp. 7-28). Academic Press.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology letters 9(5): 615-629.
- Silva (2015) Filogeografia e estrutura populacional da pescada-goete *Cynoscion jamaicensis* (Sciaenidae - Perciformes) do Atlântico Sul ocidental utilizando abordagem multilocus. M.Sc. thesis – Universidade Federal do Pará.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236:787–792.
- Smith PJ, Francis RICC, McVeagh M (1991) Loss of genetic diversity due to fishing pressure. Fish Res 10:309–316.
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A, Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CA, Robertson J (2007) Marine ecoregions of the world: A bioregionalization of coastal and shelf areas. Bioscience 57:573–583.
- Stevenson MR, Dias-Brito D, Stech JL, Kampel M (1998) How do cold water biota arrive in a tropical bay near rio de janeiro, brazil? Cont Shelf Res 18:1595–1612.
- Teodoro SSA, Silva MC, Proietti MC, Costa RC, Dumont LFC (2020) Estuarine , Coastal and Shelf Science High genetic connectivity among pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante , 1967) groups along the south-southeastern coast of Brazil. Estuar Coast Shelf Sci 232:106488.
- Torres-Florez JP, Johnson WE, Nery MF, Eizirik E, Oliveira-Miranda MA, Galetti PM (2018). The coming of age of conservation genetics in Latin America: what has been achieved and what needs to be done. Conservation genetics, 19(1), 1-15.
- Turner TF, Richardson LR, Gold JR (1998) Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (*Sciaenops ocellatus*). Mol Ecol 7:1771–1773.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
- Vasconcellos AV (2012) Diferenciação molecular de estoques de corvinas (*Micropogonias furnieri*) na costa Atlântica da América do Sul. 215. Ph.D. thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Vasconcellos AV de, Lima D, Bonhomme F, Vianna M, Solé-Cava AM (2015) Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: The whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Fish Res* 167:333–337.
- Waldman, JR (1999). The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research*, 43(1-3), 237-246.
- Wang J (2009) A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Mol Ecol* 18:2148–2164.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* 15:1419–1439.
- Weiss G (1981) Ictioplancton del estuário de Lagoa dos Patos. Tesis de Doctorado Universidad Nacional de La Plata 164p.
- Zaneti Prado EM (1979) Bionomia e ciclo de vida de *Umbrina canosai* Berg, 1895. *Bolm. Inst. Oceanogr.* 28 (1):119-165. São Paulo
- Zaneti Prado EM, Vazzoler AEA (1976) Alguns aspectos do ciclo de vida de *Umbrina canosai* na região da plataforma continental brasileira entre Cabo Frio (lat 23° S) e Torres (lat 29° 21'S). *Resumos da 28ª Reunião Anual da Soc. Brasileira para o Progresso da Ciência*: 244pp.
- Zavialov PO, Ghisolfi RD, Garcia CA (1998) An inverse model for seasonal circulation over the southern Brazilian shelf: Near-surface velocity from the heat budget. *Journal of Physical Oceanography*, 28(4), 545-562.

APÊNDICE 2: Guia para leitura de perfis de genotipagem





Os *loci* de microssatélite foram amplificados em PCR e marcados com as fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela, representada em preto). As genotipagens foram realizadas na MacroGen (dna.macrogen.com, Coreia do Sul), com o GeneScan 400 HD (*high density*), onde são lidos fragmentos de microssatélite com até 400 pares de base. Durante a genotipagem, são adicionados fragmentos de tamanho conhecido marcados com a fluorescência ROX (vermelha), utilizados como padrão para estimar o tamanho dos fragmentos das amostras (*dye set 30*).

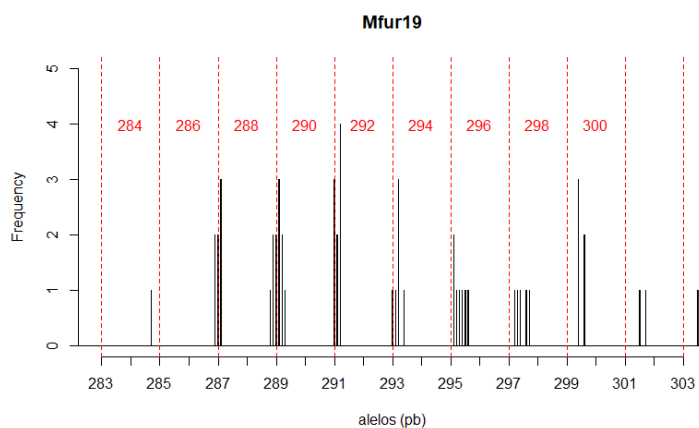
A leitura dos perfis de genotipagem foi feita no programa PEAK SCANNER™ 1.0 (Applied Biosystems), onde o eixo X representa o tamanho do fragmento em pares de base, e o eixo Y representa a intensidade da amplificação em unidade relativa de fluorescência. Conforme os padrões descritos na literatura (e.g., Selkoe & Toonen 2006 Apêndice S2, Arif et al. 2010, Guichoux et al. 2011, Flores-Rentería & Krohn 2013), segue um guia prático para diferenciar os picos verdadeiros (alelos, com um asterisco *) de artefatos de PCR:

- a) Visão total do perfil, sem zoom. É comum haver picos muito altos e fora da escala nos primeiros pares de base (artefatos). Alelos devem ser buscados dentro ou próximos ao intervalo de tamanho descrito para o *locus* microssatélite (itens abaixo com zoom nos intervalos de tamanho dos *loci*).
- b) Fragmentos de tamanho conhecido, para calibração da genotipagem 400 HD (fluorescência ROX, vermelha).
- c) Homozigoto (dois alelos de mesmo tamanho).
- d) Heterozigoto (dois alelos de tamanhos diferentes). Neste caso, os alelos possuem picos fantasma ou *stutters*, picos tipicamente mais baixos e menores que o alelo (posicionados à esquerda), produzidos por erros de replicação da Taq polimerase durante a PCR. Picos do tipo *stutter* são úteis para distinguir microssatélites de artefatos / picos não específicos, como o pico achatado na esquerda do perfil.
- e) Heterozigoto com *stutters* difíceis. Neste perfil, o primeiro alelo se distinguiu dos *stutters* por ser o pico mais alto, enquanto o segundo alelo e seus *stutters* apresentaram picos de altura semelhante, dificultando a identificação. Alelos maiores geralmente tem sinal mais fraco por competitividade na amplificação, já que a PCR é menos eficiente para fragmentos mais longos. Em casos de dúvida na identificação, o ideal é regenotipar a amostra. Mas se não for possível, uma alternativa é definir o pico correto (alelo) indiretamente, com base em alelos que tiveram boa amplificação (e.g. saber o número de *stutters* à esquerda e à direita

do alelo em um *locus*). O importante é definir um padrão e segui-lo para todas as amostras. É preciso estar atento já que o alelo maior pode produzir um pico pequeno (amplificação fraca), correndo o risco de ser ignorado.

- f) Heterozigoto com picos sobrepostos: apesar de haver três picos, não existem três alelos! Isso pode acontecer quando os dois alelos diferem em um 1 motivo de repetição: o *stutter* do alelo maior (da direita) se sobrepõe ao pico do alelo menor (da esquerda), criando esse padrão característico.
- g) Picos *spike*: são artefatos (picos finos) facilmente diferenciáveis de alelos.
- h) Pico duplo (*split peaks*): artefato produzido pela adição de um nucleotídeo (geralmente uma adenina) ao fragmento amplificado pela Taq polimerase. Não faz parte do tamanho do microssatélite. Quando a adenilação é incompleta, o resultado são picos duplos com 1 par de base de diferença, onde o primeiro pico pode ser considerado o alelo.
- i) Picos *pull-up*: artefato produzido por interferência de outra fluorescência. Neste caso, a fluorescência NED sofreu interferência da fluorescência de calibração ROX.
- j) Picos *stutter* e artefatos em excesso (como o padrão “estegossauro”), tornando a leitura inviável. A amostra deve ser descartada ou regenotipada.

Os tamanhos dos alelos são inicialmente lidos com casas decimais, devido a pequenas imprecisões na estimativa da genotipagem. A transformação para valores inteiros (tamanho do alelo propriamente dito) pode ser feito manualmente ou por programas que constroem as classes de alelos em histogramas. Exemplos são o pacote MsatAllele 1.05 (Alberto 2009) do programa R (exemplo abaixo) e o programa TANDEM (Matschiner & Salzburger 2009).



REFERÊNCIAS:

- Alberto F (2009) MsatAllele-1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *J Hered* 100:394–397.
- Arif IA, Khan HA, Shobrak M, Al Homaidan AA, Al Sadoon M, Al Farhan AH, Bahkali AH (2010). Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 259-265.
- Flores-Rentería L, Krohn A (2013) Scoring microsatellite loci. *Methods Mol Biol* 1006:319–336.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611.
- Matschiner M, Salzburger W (2009) TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25(15), 1982-1983.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9(5): 615-629.

APÊNDICE 3: Dados genéticos

Genótipos e frequências alélicas de *Umbrina canosai* no Atlântico Sudoeste utilizadas neste trabalho. Genótipos ajustados pelo MICRO-CHECKER e no formato GENEPOP. Frequências alélicas geradas pelo FSTAT, com frequências totais ponderadas (All_W) e não ponderadas (All_UW) pelo tamanho amostral.

Microsatelites de castanha (*Umbrina canosai*)

Mfur02

Mfur03

Mfur06

Mfur14

Mfur19

Mfur25

Mfur26

Soc050

Soc085

Soc204

POP

UCRJ152 , 218224 234242 257257 238238 288288 146172 000000 205245 122122 214214
 UCRJ153 , 218228 236236 259273 238238 288290 172198 000000 205211 122126 208208
 UCRJ154 , 226226 236236 259291 240246 000000 178192 264274 209215 122122 000000
 UCRJ155 , 226240 236252 261261 240252 000000 162174 000000 223229 122122 214232
 UCRJ156 , 228232 238262 265265 244244 000000 000000 000000 217239 126134 000000
 UCRJ157 , 228232 240240 265271 244248 290306 174202 000000 209209 136178 217220
 UCRJ158 , 228234 242258 267267 244274 000000 192220 000000 205207 124124 214220
 UCRJ159 , 228234 248258 267293 000000 000000 166206 000000 209215 124124 214214
 UCRJ160 , 228278 250250 269293 246248 292292 172176 000000 211267 122150 208211
 UCRJ161 , 000000 000000 271281 246252 296306 174174 000000 205207 000000 217220
 UCRJ162 , 230230 000000 275301 246254 296318 160202 000000 207261 122174 217220
 UCRJ163 , 230238 000000 281281 246256 304304 178178 266266 213229 130130 214217
 UCRJ164 , 230242 000000 285291 000000 000000 176188 266266 205221 122126 000000
 UCRJ165 , 230242 000000 295295 000000 000000 184196 266268 205211 122146 211220
 UCRJ166 , 230252 000000 301301 248250 328328 182210 000000 215215 126148 214217
 UCRJ168 , 230254 000000 000000 248250 000000 154174 000000 221249 122126 000000
 UCRJ169 , 232238 000000 000000 248250 000000 188214 270270 221237 126178 000000
 UCRJ171 , 234268 000000 000000 248252 000000 192194 000000 215271 124134 214214
 UCRJ172 , 236236 000000 000000 248256 000000 154208 000000 207209 124128 220220
 UCRJ173 , 236238 000000 000000 000000 000000 168168 000000 211241 122132 000000
 UCRJ174 , 236240 000000 000000 250250 000000 188196 000000 223245 118124 214217
 UCRJ175 , 238238 000000 000000 250250 000000 158174 000000 211257 124156 208217
 UCRJ178 , 238240 000000 000000 000000 000000 172178 000000 207217 128134 000000
 UCRJ179 , 238240 000000 000000 252254 000000 158178 000000 207207 122130 217217
 UCRJ182 , 242242 000000 000000 252264 000000 158186 000000 211235 122162 214214
 UCRJ184 , 244244 000000 000000 254254 000000 146228 000000 205219 126126 214214
 UCRJ186 , 246246 000000 000000 254258 000000 184194 000000 205247 122128 214214

UCRJ187 , 000000 000000 000000 254258 000000 178186 000000 219243 126140 214217
 UCRJ188 , 000000 000000 000000 264264 000000 174184 000000 221243 118168 214217
 UCRJ189 , 000000 000000 000000 264270 000000 174174 000000 205205 000000 217217
 RJ , 000000 000000 000000 000000 000000 168178 000000 207221 122124 214214

POP

UCSP202 , 230252 230262 255307 238244 278296 186226 000000 209237 116148 205205
 UCSP203 , 000000 232246 257257 238244 288324 178184 000000 209225 126126 205217
 UCSP204 , 224226 234252 257257 240240 290290 174184 264264 225241 144150 205217
 UCSP205 , 218228 236252 259259 240250 292292 158190 000000 205213 000000 208217
 UCSP207 , 240252 236268 259289 242248 294294 174178 000000 207207 114122 211214
 UCSP208 , 228228 238238 267267 242254 294308 146172 000000 205209 132142 000000
 UCSP209 , 236236 242242 271275 242268 296318 146176 000000 205205 128184 000000
 UCSP210 , 228234 242274 271281 244246 298336 184204 000000 000000 000000 000000
 UCSP211 , 230232 244258 271307 244246 000000 158172 000000 205219 116164 214214
 UCSP212 , 238242 000000 273291 244248 300300 158174 000000 203209 000000 214214
 UCSP213 , 000000 252252 273291 246246 300314 182194 000000 229235 124126 214214
 UCSP214 , 236244 254270 275293 246248 000000 178182 000000 203253 126130 214214
 UCSP215 , 228238 260260 277277 246248 306306 158190 000000 215243 126154 214214
 UCSP216 , 230244 262262 277281 246250 000000 146160 000000 205241 124132 214217
 UCSP217 , 238252 268268 277299 246254 308310 176182 266266 205241 124126 214217
 UCSP218 , 230250 000000 279281 248248 312326 158166 266266 207253 142160 214217
 UCSP219 , 226230 000000 281287 248248 314314 000000 266266 211261 122134 214217
 UCSP220 , 224238 000000 289289 248250 316316 188188 000000 000000 000000 214220
 UCSP221 , 000000 000000 289293 248252 318318 174186 000000 205235 154174 214220
 UCSP222 , 226228 000000 291305 248252 320320 158160 000000 205223 122136 000000
 UCSP223 , 228230 000000 299299 250254 000000 154192 000000 207217 128152 000000
 UCSP224 , 226232 000000 000000 250254 000000 158166 268268 233239 122124 217217
 UCSP225 , 000000 000000 000000 250258 000000 000000 268270 205247 124130 217220
 UCSP226 , 228228 000000 000000 250268 000000 000000 270276 000000 000000 217220
 UCSP228 , 234244 000000 000000 252252 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 UCSP232 , 000000 000000 000000 252252 000000 178186 000000 205205 124124 220223
 UCSP237 , 000000 000000 000000 262264 000000 178208 000000 221223 140184 000000
 UCSP244 , 238246 000000 000000 280280 000000 172178 000000 000000 000000 000000
 UCSP246 , 236240 000000 000000 000000 000000 146158 000000 215233 158158 000000
 UCSP247 , 226262 000000 000000 000000 000000 158172 000000 205205 122166 000000
 UCSP249 , 232232 000000 000000 000000 000000 170182 000000 241241 126142 000000
 SP , 236262 000000 000000 000000 000000 156176 000000 221247 124178 000000

POP

UCRS001 , 244280 226226 287293 240240 278294 172174 000000 000000 000000 214214
 UCRS002 , 222238 230230 000000 240242 288312 174176 000000 205205 124126 214214
 UCRS003 , 226236 230240 000000 240264 288324 176190 000000 215217 140170 214217
 UCRS004 , 228238 232232 000000 242242 288326 162182 264268 219239 136162 214217
 UCRS005 , 228228 232234 287309 242262 290290 182186 264272 245257 126126 217223
 UCRS006 , 000000 234234 275301 244248 290322 184208 000000 235279 122126 214232
 UCRS007 , 234242 234260 281285 244252 290338 176184 000000 205211 124168 214220

UCRS008 , 240284 236242 000000 246246 292304 146174 000000 205207 122122 214217
 UCRS009 , 224244 238238 281291 246250 292318 178188 000000 205215 000000 211226
 UCRS020 , 236266 240244 261261 248248 294308 000000 000000 000000 000000 000000
 UCRS021 , 238246 242242 273299 248248 294308 158170 000000 209219 122122 214220
 UCRS022 , 226268 242248 000000 248250 296296 156158 000000 209221 118144 211235
 UCRS023 , 230250 244254 265269 248252 298316 146190 000000 215247 126168 214214
 UCRS024 , 232262 244286 287299 248252 298318 000000 000000 000000 000000 000000
 UCRS026 , 226264 000000 000000 248252 298336 158178 000000 235249 116122 214217
 UCRS028 , 242256 246246 261277 248258 302302 158184 000000 207213 126134 214214
 UCRS030 , 236240 246252 285291 248262 302316 000000 000000 000000 000000 000000
 UCRS035 , 230230 246266 293295 248266 304310 000000 266266 000000 000000 000000
 UCRS042 , 226242 248248 261271 248274 306306 158174 266266 205237 122128 214217
 UCRS043 , 222228 250272 265295 250250 306310 158184 266266 000000 000000 214214
 UCRS044 , 240240 252258 273275 250262 308322 174188 266266 207221 000000 214214
 UCRS045 , 220230 254266 293297 250268 312312 182186 000000 211215 126174 208229
 UCRS046 , 218238 256256 295303 252254 316316 170176 000000 215239 122140 214223
 UCRS047 , 240252 260272 289293 252256 324324 178182 000000 205207 126128 217220
 UCRS048 , 232236 000000 257257 252260 328340 164168 000000 219239 142182 211214
 UCRS049 , 222230 000000 273299 252260 338338 186194 268270 205265 146180 214217
 UCRS050 , 238262 000000 257297 252262 000000 158178 000000 207249 122128 214214
 UCRS057 , 226226 000000 281293 254256 000000 160196 000000 205225 118148 217217
 UCRS058 , 232234 000000 261275 254258 000000 194214 280280 233241 118134 214214
 UCRS059 , 230238 000000 273305 264264 000000 146168 000000 219219 120126 214214
 UCRS060 , 234246 000000 267285 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 UCRS061 , 246284 000000 275281 000000 000000 172178 000000 207207 124130 214220
 UCRS062 , 234248 000000 293301 000000 000000 174174 000000 205219 126156 214214
 RS , 226244 000000 271281 000000 000000 176206 000000 207217 128140 214223

POP

UCAR121 , 218246 000000 259265 248276 284324 178184 266268 209231 122126 214214
 UCAR122 , 226238 000000 261265 240248 290290 158178 266268 205205 122122 214220
 UCAR125 , 228230 234246 263263 000000 296296 000000 000000 000000 000000 000000
 UCAR127 , 228230 252252 269271 252252 304322 148182 266268 207261 130136 214217
 UCAR128 , 230230 254258 269305 246248 304324 162176 266266 205205 124124 217217
 UCAR129 , 230234 000000 271271 248264 306310 200202 264264 219261 122146 214214
 UCAR130 , 230236 232246 271273 246246 306314 174184 266266 209215 128186 214223
 UCAR131 , 232232 228272 273313 248264 306316 146182 266266 205231 138180 214214
 UCAR132 , 232240 000000 275275 248254 314354 172186 264264 205205 124178 211214
 UCAR133 , 232242 246260 279279 252268 000000 172176 268268 205215 128132 214217
 UCAR134 , 238254 000000 281323 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 UCAR135 , 240240 240266 281289 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 UCAR136 , 246246 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 UCAR137 , 250272 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000
 SCT , 258262 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000

POP

UCAR095 , 228242 252252 289291 238248 288296 000000 000000 203247 122124 214217

UCAR096 , 226264 000000 000000 238270 292292 178186 000000 221237 126126 214214
 UCAR097 , 244276 000000 279281 240250 292292 000000 264264 209257 122136 214217
 UCAR098 , 252254 226264 269305 242248 294304 146178 264276 215225 124130 214229
 UCAR099 , 248248 000000 279303 244262 298298 166174 000000 000000 000000 000000
 UCAR102 , 228248 000000 281281 246246 300300 174184 000000 197209 122126 214214
 UCAR103 , 224240 234246 263291 000000 300304 198202 000000 219265 128148 217217
 UCAR104 , 224266 250262 265285 000000 304308 178182 266270 205207 126126 214220
 UCAR105 , 242248 000000 271275 248258 306318 176188 266274 205221 114118 214217
 UCAR106 , 234246 248264 265265 250264 310322 146182 266274 207257 124132 214214
 UCAR107 , 226234 232252 273279 252252 314314 172188 000000 207217 124150 214214
 UCAR108 , 248252 246264 000000 252252 322330 000000 000000 211241 124142 214220
 UCAR109 , 234236 260266 277315 258258 326336 186194 268268 205207 120128 214214
 UCAR110 , 242252 234240 261277 260260 000000 172198 268268 209209 122124 214220
 UCAR111 , 220220 226264 261289 260260 000000 162182 000000 205219 122122 214217
 NEC , 228232 000000 277301 000000 000000 174178 000000 205209 124128 214220

	pop1	pop2	pop3	pop4	pop5	All_W	All_UW
Locus: Mfur02							
N	26	26	33	15	16		
p: 218	0.038	0.019	0.015	0.033	0.000	0.022	0.021
p: 220	0.000	0.000	0.015	0.000	0.063	0.013	0.016
p: 222	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.013	0.009
p: 224	0.019	0.038	0.015	0.000	0.063	0.026	0.027
p: 226	0.058	0.096	0.106	0.033	0.063	0.078	0.071
p: 228	0.115	0.173	0.061	0.067	0.094	0.103	0.102
p: 230	0.135	0.115	0.091	0.200	0.000	0.108	0.108
p: 232	0.058	0.077	0.045	0.133	0.031	0.065	0.069
p: 234	0.058	0.038	0.061	0.033	0.094	0.056	0.057
p: 236	0.077	0.096	0.061	0.033	0.031	0.065	0.060
p: 238	0.135	0.096	0.091	0.067	0.000	0.086	0.078
p: 240	0.077	0.038	0.076	0.100	0.031	0.065	0.064
p: 242	0.077	0.019	0.045	0.033	0.094	0.052	0.054
p: 244	0.038	0.058	0.045	0.000	0.031	0.039	0.035
p: 246	0.038	0.019	0.045	0.100	0.031	0.043	0.047
p: 248	0.000	0.000	0.015	0.000	0.156	0.026	0.034
p: 250	0.000	0.019	0.015	0.033	0.000	0.013	0.014
p: 252	0.019	0.058	0.015	0.000	0.094	0.034	0.037
p: 254	0.019	0.000	0.000	0.033	0.031	0.013	0.017
p: 256	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.004	0.003
p: 258	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.004	0.007
p: 262	0.000	0.038	0.030	0.033	0.000	0.022	0.020
p: 264	0.000	0.000	0.015	0.000	0.031	0.009	0.009
p: 266	0.000	0.000	0.015	0.000	0.031	0.009	0.009
p: 268	0.019	0.000	0.015	0.000	0.000	0.009	0.007
p: 272	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.004	0.007
p: 276	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.004	0.006
p: 278	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004
p: 280	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.004	0.003
p: 284	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000	0.009	0.006

Locus: Mfur03							
N	9	14	23	7	10		
p: 226	0.000	0.000	0.043	0.000	0.100	0.032	0.029
p: 228	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.008	0.014
p: 230	0.000	0.036	0.065	0.000	0.000	0.032	0.020
p: 232	0.000	0.036	0.065	0.071	0.050	0.048	0.044

p: 234	0.056	0.036	0.087	0.071	0.100	0.071	0.070
p: 236	0.278	0.071	0.022	0.000	0.000	0.063	0.074
p: 238	0.056	0.071	0.043	0.000	0.000	0.040	0.034
p: 240	0.111	0.000	0.043	0.071	0.050	0.048	0.055
p: 242	0.111	0.107	0.087	0.000	0.000	0.071	0.061
p: 244	0.000	0.036	0.065	0.000	0.000	0.032	0.020
p: 246	0.000	0.036	0.087	0.214	0.100	0.079	0.087
p: 248	0.056	0.000	0.065	0.000	0.050	0.040	0.034
p: 250	0.111	0.000	0.022	0.000	0.050	0.032	0.037
p: 252	0.056	0.143	0.043	0.143	0.150	0.095	0.107
p: 254	0.000	0.036	0.043	0.071	0.000	0.032	0.030
p: 256	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.016	0.009
p: 258	0.111	0.036	0.022	0.071	0.000	0.040	0.048
p: 260	0.000	0.071	0.043	0.071	0.050	0.048	0.047
p: 262	0.056	0.107	0.000	0.000	0.050	0.040	0.043
p: 264	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.032	0.040
p: 266	0.000	0.000	0.043	0.071	0.050	0.032	0.033
p: 268	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.024	0.021
p: 270	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.008	0.007
p: 272	0.000	0.000	0.043	0.071	0.000	0.024	0.023
p: 274	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.008	0.007
p: 286	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.008	0.004

Locus: Mfur06

N	15	21	28	12	14		
p: 255	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.006	0.005
p: 257	0.067	0.095	0.054	0.000	0.000	0.050	0.043
p: 259	0.067	0.071	0.000	0.042	0.000	0.033	0.036
p: 261	0.067	0.000	0.089	0.042	0.071	0.056	0.054
p: 263	0.000	0.000	0.000	0.083	0.036	0.017	0.024
p: 265	0.100	0.000	0.036	0.083	0.107	0.056	0.065
p: 267	0.100	0.048	0.018	0.000	0.000	0.033	0.033
p: 269	0.033	0.000	0.018	0.083	0.036	0.028	0.034
p: 271	0.067	0.071	0.036	0.167	0.036	0.067	0.075
p: 273	0.033	0.048	0.071	0.083	0.036	0.056	0.054
p: 275	0.033	0.048	0.071	0.083	0.036	0.056	0.054
p: 277	0.000	0.095	0.018	0.000	0.107	0.044	0.044
p: 279	0.000	0.024	0.000	0.083	0.107	0.033	0.043
p: 281	0.100	0.095	0.089	0.083	0.107	0.094	0.095
p: 285	0.033	0.000	0.054	0.000	0.036	0.028	0.025
p: 287	0.000	0.024	0.054	0.000	0.000	0.022	0.015
p: 289	0.000	0.095	0.018	0.042	0.071	0.044	0.045
p: 291	0.067	0.071	0.036	0.000	0.071	0.050	0.049
p: 293	0.067	0.048	0.107	0.000	0.000	0.056	0.044
p: 295	0.067	0.000	0.054	0.000	0.000	0.028	0.024
p: 297	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.011	0.007
p: 299	0.000	0.071	0.054	0.000	0.000	0.033	0.025
p: 301	0.100	0.000	0.036	0.000	0.036	0.033	0.034
p: 303	0.000	0.000	0.018	0.000	0.036	0.011	0.011
p: 305	0.000	0.024	0.018	0.042	0.036	0.022	0.024
p: 307	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.011	0.010
p: 309	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.006	0.004
p: 313	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.006	0.008
p: 315	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.006	0.007
p: 323	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.006	0.008

Locus: Mfur14

N	25	28	30	9	13		
p: 238	0.080	0.036	0.000	0.000	0.077	0.038	0.039
p: 240	0.040	0.054	0.067	0.056	0.038	0.052	0.051
p: 242	0.000	0.054	0.067	0.000	0.038	0.038	0.032
p: 244	0.080	0.089	0.033	0.000	0.038	0.057	0.048
p: 246	0.100	0.143	0.050	0.167	0.077	0.100	0.107
p: 248	0.140	0.196	0.217	0.333	0.115	0.190	0.200
p: 250	0.140	0.125	0.100	0.000	0.077	0.105	0.088

p: 252	0.100	0.107	0.150	0.167	0.154	0.129	0.136
p: 254	0.120	0.071	0.050	0.056	0.000	0.067	0.059
p: 256	0.040	0.000	0.033	0.000	0.000	0.019	0.015
p: 258	0.040	0.018	0.033	0.000	0.115	0.038	0.041
p: 260	0.000	0.000	0.033	0.000	0.154	0.029	0.037
p: 262	0.000	0.018	0.067	0.000	0.038	0.029	0.025
p: 264	0.080	0.018	0.050	0.111	0.038	0.052	0.059
p: 266	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 268	0.000	0.036	0.017	0.056	0.000	0.019	0.022
p: 270	0.020	0.000	0.000	0.000	0.038	0.010	0.012
p: 274	0.020	0.000	0.017	0.000	0.000	0.010	0.007
p: 276	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.005	0.011
p: 280	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.010	0.007

Locus: Mfur19

N	8	17	26	9	13		
p: 278	0.000	0.029	0.019	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 284	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.007	0.011
p: 288	0.188	0.029	0.058	0.000	0.038	0.055	0.063
p: 290	0.125	0.059	0.077	0.111	0.000	0.068	0.074
p: 292	0.125	0.059	0.038	0.000	0.154	0.068	0.075
p: 294	0.000	0.088	0.058	0.000	0.038	0.048	0.037
p: 296	0.125	0.059	0.038	0.111	0.038	0.062	0.074
p: 298	0.000	0.029	0.058	0.000	0.077	0.041	0.033
p: 300	0.000	0.088	0.000	0.000	0.115	0.041	0.041
p: 302	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000	0.021	0.012
p: 304	0.125	0.000	0.038	0.111	0.115	0.062	0.078
p: 306	0.125	0.059	0.058	0.167	0.038	0.075	0.089
p: 308	0.000	0.059	0.058	0.000	0.038	0.041	0.031
p: 310	0.000	0.029	0.038	0.056	0.038	0.034	0.032
p: 312	0.000	0.029	0.058	0.000	0.000	0.027	0.017
p: 314	0.000	0.088	0.000	0.111	0.077	0.048	0.055
p: 316	0.000	0.059	0.077	0.056	0.000	0.048	0.038
p: 318	0.063	0.088	0.038	0.000	0.038	0.048	0.046
p: 320	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.014	0.012
p: 322	0.000	0.000	0.038	0.056	0.077	0.034	0.034
p: 324	0.000	0.029	0.058	0.111	0.000	0.041	0.040
p: 326	0.000	0.029	0.019	0.000	0.038	0.021	0.017
p: 328	0.125	0.000	0.019	0.000	0.000	0.021	0.029
p: 330	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.007	0.008
p: 336	0.000	0.029	0.019	0.000	0.038	0.021	0.017
p: 338	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000	0.021	0.012
p: 340	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.007	0.004
p: 354	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.007	0.011

Locus: Mfur25

N	30	28	29	9	13		
p: 146	0.033	0.071	0.052	0.056	0.077	0.055	0.058
p: 148	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.005	0.011
p: 154	0.033	0.018	0.000	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 156	0.000	0.018	0.017	0.000	0.000	0.009	0.007
p: 158	0.050	0.161	0.121	0.056	0.000	0.092	0.077
p: 160	0.017	0.036	0.017	0.000	0.000	0.018	0.014
p: 162	0.017	0.000	0.017	0.056	0.038	0.018	0.026
p: 164	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 166	0.017	0.036	0.000	0.000	0.038	0.018	0.018
p: 168	0.050	0.000	0.034	0.000	0.000	0.023	0.017
p: 170	0.000	0.018	0.034	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 172	0.067	0.071	0.034	0.111	0.077	0.064	0.072
p: 174	0.150	0.071	0.121	0.056	0.115	0.110	0.103
p: 176	0.033	0.054	0.086	0.111	0.038	0.060	0.065
p: 178	0.117	0.107	0.086	0.111	0.154	0.110	0.115
p: 182	0.017	0.071	0.069	0.111	0.115	0.064	0.077
p: 184	0.050	0.054	0.069	0.111	0.038	0.060	0.064
p: 186	0.033	0.054	0.052	0.056	0.077	0.050	0.054

p: 188	0.050	0.036	0.034	0.000	0.077	0.041	0.039
p: 190	0.000	0.036	0.034	0.000	0.000	0.018	0.014
p: 192	0.050	0.018	0.000	0.000	0.000	0.018	0.014
p: 194	0.033	0.018	0.034	0.000	0.038	0.028	0.025
p: 196	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 198	0.017	0.000	0.000	0.000	0.077	0.014	0.019
p: 200	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.005	0.011
p: 202	0.033	0.000	0.000	0.056	0.038	0.018	0.025
p: 204	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 206	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.009	0.007
p: 208	0.017	0.018	0.017	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 210	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 214	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.009	0.007
p: 220	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 226	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 228	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.003

Locus: Mfur26

N	5	7	8	9	7		
p: 264	0.100	0.143	0.125	0.222	0.214	0.167	0.161
p: 266	0.500	0.429	0.500	0.500	0.214	0.431	0.429
p: 268	0.100	0.214	0.125	0.278	0.286	0.208	0.201
p: 270	0.200	0.143	0.063	0.000	0.071	0.083	0.095
p: 272	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.014	0.013
p: 274	0.100	0.000	0.000	0.000	0.143	0.042	0.049
p: 276	0.000	0.071	0.000	0.000	0.071	0.028	0.029
p: 280	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.028	0.025

Locus: Soc050

N	31	27	27	9	15		
p: 197	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.005	0.007
p: 203	0.000	0.037	0.000	0.000	0.033	0.014	0.014
p: 205	0.161	0.259	0.185	0.444	0.167	0.216	0.243
p: 207	0.129	0.074	0.148	0.056	0.133	0.115	0.108
p: 209	0.081	0.074	0.037	0.111	0.167	0.083	0.094
p: 211	0.097	0.019	0.037	0.000	0.033	0.046	0.037
p: 213	0.016	0.019	0.019	0.000	0.000	0.014	0.011
p: 215	0.081	0.037	0.093	0.111	0.033	0.069	0.071
p: 217	0.032	0.019	0.037	0.000	0.033	0.028	0.024
p: 219	0.032	0.019	0.111	0.056	0.067	0.055	0.057
p: 221	0.081	0.037	0.037	0.000	0.067	0.050	0.044
p: 223	0.032	0.037	0.000	0.000	0.000	0.018	0.014
p: 225	0.000	0.037	0.019	0.000	0.033	0.018	0.018
p: 229	0.032	0.019	0.000	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 231	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.009	0.022
p: 233	0.000	0.037	0.019	0.000	0.000	0.014	0.011
p: 235	0.016	0.037	0.037	0.000	0.000	0.023	0.018
p: 237	0.016	0.019	0.019	0.000	0.033	0.018	0.017
p: 239	0.016	0.019	0.056	0.000	0.000	0.023	0.018
p: 241	0.016	0.093	0.019	0.000	0.033	0.037	0.032
p: 243	0.032	0.019	0.000	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 245	0.032	0.000	0.019	0.000	0.000	0.014	0.010
p: 247	0.016	0.037	0.019	0.000	0.033	0.023	0.021
p: 249	0.016	0.000	0.037	0.000	0.000	0.014	0.011
p: 253	0.000	0.037	0.000	0.000	0.000	0.009	0.007
p: 257	0.016	0.000	0.019	0.000	0.067	0.018	0.020
p: 261	0.016	0.019	0.000	0.111	0.000	0.018	0.029
p: 265	0.000	0.000	0.019	0.000	0.033	0.009	0.010
p: 267	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 271	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 279	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.005	0.004

Locus: Soc085

N	29	25	25	9	15		
p: 114	0.000	0.020	0.000	0.000	0.033	0.010	0.011
p: 116	0.000	0.040	0.020	0.000	0.000	0.015	0.012
p: 118	0.034	0.000	0.060	0.000	0.033	0.029	0.026
p: 120	0.000	0.000	0.020	0.000	0.033	0.010	0.011
p: 122	0.293	0.100	0.180	0.222	0.200	0.199	0.199
p: 124	0.155	0.160	0.060	0.167	0.233	0.146	0.155
p: 126	0.155	0.140	0.200	0.056	0.167	0.155	0.143
p: 128	0.052	0.040	0.080	0.111	0.100	0.068	0.077
p: 130	0.052	0.040	0.020	0.056	0.033	0.039	0.040
p: 132	0.017	0.040	0.000	0.056	0.033	0.024	0.029
p: 134	0.052	0.020	0.040	0.000	0.000	0.029	0.022
p: 136	0.017	0.020	0.020	0.056	0.033	0.024	0.029
p: 138	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.005	0.011
p: 140	0.017	0.020	0.060	0.000	0.000	0.024	0.019
p: 142	0.000	0.060	0.020	0.000	0.033	0.024	0.023
p: 144	0.000	0.020	0.020	0.000	0.000	0.010	0.008
p: 146	0.017	0.000	0.020	0.056	0.000	0.015	0.019
p: 148	0.017	0.020	0.020	0.000	0.033	0.019	0.018
p: 150	0.017	0.020	0.000	0.000	0.033	0.015	0.014
p: 152	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 154	0.000	0.040	0.000	0.000	0.000	0.010	0.008
p: 156	0.017	0.000	0.020	0.000	0.000	0.010	0.007
p: 158	0.000	0.040	0.000	0.000	0.000	0.010	0.008
p: 160	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 162	0.017	0.000	0.020	0.000	0.000	0.010	0.007
p: 164	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 166	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 168	0.017	0.000	0.040	0.000	0.000	0.015	0.011
p: 170	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 174	0.017	0.020	0.020	0.000	0.000	0.015	0.011
p: 178	0.034	0.020	0.000	0.056	0.000	0.019	0.022
p: 180	0.000	0.000	0.020	0.056	0.000	0.010	0.015
p: 182	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.005	0.004
p: 184	0.000	0.040	0.000	0.000	0.000	0.010	0.008
p: 186	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.005	0.011

Locus: Soc204

N	24	20	29	9	15		
p: 205	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.021	0.020
p: 208	0.083	0.025	0.017	0.000	0.000	0.031	0.025
p: 211	0.042	0.025	0.052	0.056	0.000	0.036	0.035
p: 214	0.438	0.425	0.569	0.611	0.633	0.521	0.535
p: 217	0.271	0.275	0.172	0.222	0.200	0.227	0.228
p: 220	0.146	0.125	0.069	0.056	0.133	0.108	0.106
p: 223	0.000	0.025	0.052	0.056	0.000	0.026	0.026
p: 226	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.005	0.003
p: 229	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.010	0.010
p: 232	0.021	0.000	0.017	0.000	0.000	0.010	0.008
p: 235	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.005	0.003