

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO
UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PESCADINHAS
DO GÊNERO *Macrodon* NO LITORAL CENTRAL
DO BRASIL**

GABRIEL ZOEGA CAVALHEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO
UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PESCADINHAS DO GENERO *Macrodon* NO LITORAL CENTRAL DO BRASIL

GABRIEL ZOEGA CAVALHEIRO

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientadora: Ana Paula Cazerta Farro
Co-Orientadora: Mylla Carla Cescon Freire



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **GABRIEL ZOECA CAVALHEIRO**

Título: **Identificação molecular de pescadinhas do gênero *Macrodon* no litoral central do Brasil**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 13/03/2025

Documento assinado digitalmente



ANA PAULA CAZERTA FARRO DA ROSA
Data: 27/03/2025 13:48:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Ana Paula Cazerta Farro da Rosa
(orientador e presidente da banca)

Documento assinado digitalmente



MYLLA CARLA CESCION FREIRE
Data: 26/03/2025 15:11:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mylla Carla Cescon Freire
(Co-orientadora)

Documento assinado digitalmente



JOELSON MUSIELLO FERNANDES
Data: 27/03/2025 09:33:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Joelson Musiello Fernandes
(Examinador 1)

Documento assinado digitalmente



LORENA LOPES ALMEIDA
Data: 27/03/2025 11:24:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Lorena Lopes Almeida
(Examinador 2)

Centro Universitário Norte do Espírito Santo

Rodovia BR 101 Norte, Km. 60, Bairro Litorâneo, CEP 29932-540
São Mateus - ES

Sítio eletrônico: <http://www.ceunes.ufes.br>

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 - Coleta	13
3.2 - Extração do DNA e quantificação	14
3.3 - Amplificação por PCR	15
3.4 - Análise de dados	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4.1 – Resultados	16
4.2 – Discussão	22
5 CONCLUSÕES	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de sequências obtidas nos bancos de dados *GenBank* e *BOLD*.

Tabela 2. Tabela de amostras utilizadas no projeto com a identificação morfológica, e molecular segundo os bancos de dados *GenBank* e *BOLD*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de *Macrodon ancylodon* (Carvalho-Filho, 1995).

Figura 2. Exemplar de *Macrodon atricauda* (Carvalho-Filho et al., 2010).

Figura 3. Mapa de locais de coleta, gerado a partir do programa QGIS 3.38.0.

Figura 4. Árvore de *Neighbor-Joining* gerada com as sequências recolhidas nos bancos de dados genéticos, e amostras do projeto.

Figura 5. Mapa de locais de coleta e limites de incidência, gerado a partir do programa QGIS 3.38.0. modificado manualmente.

Agradecimentos

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus por todas as bênçãos e maravilhas que tem feito em minha vida, por todas as promessas cumpridas e toda misericórdia que demonstrou comigo.

Agradeço a minha amada mãe por sempre estar ao meu lado, ter me sustentado, me ajudado e me acolhido em toda a minha trajetória e ter sido paciente comigo por todos esses anos, sempre ter confiado no meu potencial ao longo desses anos e ter me ensinado os caminhos do Senhor.

Agradeço ao meu pai por ser um exemplo de homem, com o qual pude seguir e sempre pude contar, por sempre ter me direcionado, me ensinou a como ser não apenas um bom homem, mas uma boa pessoa, me ensinando como ser sábio sem ser sério, ser brincalhão sem ser tolo.

Agradeço aos meus amigos que ao longo dos anos sempre me incentivaram a continuar seguindo em frente e terem aliviado meu estresse.

Agradeço aos meus colegas de laboratório do GECOM que me acolheram e sempre me trataram com respeito e carinho, em principal agradeço a minha orientadora e co-orientadora, Ana por ter me direcionado ao longo destes anos, e ter sido uma professora maravilhosa que me mostrou as possibilidades que existem na área, e Mylla por ter me ensinado e ajudado tanto com meu começo no laboratório, ambas sempre sendo extremamente compreensivas e pacientes comigo, e me ajudando a corrigir meus erros sem nunca ter me destrutado por cometê-los, foram minhas mães nas ciências, e sempre serei eternamente grato por todos que me ajudaram. Foi graças a todos vocês que hoje pude estar aqui.

- Isaías 41:13

“Porque eu, o Senhor teu Deus, te tomo pela tua mão direita; e te digo: Não temas, eu te ajudo.”

Resumo

O gênero *Macrodon*, família *Sciaenidae*, é composto por peixes demersais que habitam regiões costeiras e estuarinas. Por sua abundância, esses são considerados um recurso pesqueiro de grande importância econômica para todo o Brasil e um controle adequado do manejo deste recurso torna-se essencial. Análises a nível molecular, que podem promover maior precisão na identificação desses pescados, são indispensáveis, tanto para fins acadêmicos, para possíveis ações de conservação, como também para fins mercadológicos, dando maior segurança para quem o comercializa, e ao consumidor, com a certeza de que está recebendo o produto correto. Fraudes e erros envolvendo comércio de pescado frequentemente ocorrem, principalmente na venda das pescadinhas, cujo nome e espécie pode variar de região para região. Este trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular do gênero *Macrodon* no litoral central do Brasil, e ampliar as discussões sobre a dificuldade de identificação desses peixes. Para tal, foram analisados 74 indivíduos. O DNA de tecido muscular foi extraído por método de extração salina e suas concentrações foram definidas e padronizadas. Após a amplificação com o marcador COI (600bp) e o sequenciamento dos fragmentos, as sequências geradas foram submetidas ao GenBank e BOLD para análise de homologia. Em seguida, essas foram comparadas com outras sequências obtidas nesses bancos de dados para criação de uma árvore de *Neighbor-Joining*. Tanto a criação da árvore, quanto a edição manual das sequências, foram feitas através do programa MEGA. Foi possível observar que os dados obtidos por análises morfológicas e moleculares, quando comparados entre si, apresentam diferenças, sendo evidenciadas 13 sequências incongruentes (17,5%). Em relação à árvore, não foram evidenciados agrupamentos bem definidos para *Macrodon atricauda* e *M. ancylodon*. Isso pode acontecer devido ao fato de uma grande semelhança morfológica entre as duas espécies. Durante anos a espécie *M. atricauda* foi considerada sinônimo da espécie *M. ancylodon*, sendo tratada como uma população subtropical, podendo então, ter ocasionado a inclusão de sequências erroneamente classificadas nos bancos de dados genéticos. Além destes problemas os indivíduos utilizados neste trabalho foram capturados em zonas consideradas de transição entre ambas as espécies, levantando a possibilidade da formação de híbridos. Sendo assim, fica evidente a necessidade da obtenção e análise de novos dados em futuros estudos referentes ao tema.

Palavras-chave: COI, *Macrodon ancylodon*, *Macroion atricauda*, Pescadinha, Southern king weakfish, King weakfish.

Abstract

The genus *Macrodon*, family Sciaenidae, is made up of demersal fish that inhabit coastal and estuarine regions. Due to their abundance, they are considered a fishery resource of great economic importance for all of Brazil and proper management control of this resource is essential. Molecular analysis, which can promote greater precision in the identification of these fish, is indispensable, both for academic purposes, for possible conservation actions, and also for marketing purposes, giving greater security to those who sell it, and to the consumer, with the certainty that they are receiving the correct product. Frauds and errors involving the fish trade often occur, especially in the sale of king weakfish, the name and species of which can vary from region to region. The aim of this study was to carry out molecular identification of the genus *Macrodon* in the central coast of Brazil and to expand discussions on the difficulty of identifying these fish. To this end, 74 individuals were analyzed. DNA from muscle tissue was extracted using the saline extraction method and its concentrations were defined and standardized. After amplification with the COI marker (600bp) and sequencing of the fragments, the sequences generated were submitted to GenBank and BOLD for homology analysis. These were then compared with other sequences taken from these databases to create a Neighbor-Joining tree. Both the creation of the tree and the manual editing of the sequences were done using the MEGA program. It was possible to observe that the data obtained from the morphological and molecular analyses showed differences when compared to each other, with 13 incongruous sequences (17.5%). In relation to the tree, there were no well-defined groupings for *Macrodon atricauda* and *M. ancylodon*. This may be due to the great morphological similarity between the two species. For years, the species *M. atricauda* was considered synonymous with the species *M. ancylodon* and was treated as a subtropical population, which may have led to the inclusion of wrongly classified sequences in genetic databases. In addition to these problems, the individuals used in this study were captured in areas considered to be transitional between the two species, raising the possibility of the formation of hybrids. It is therefore clear that new data needs to be obtained and analyzed in future studies on the subject.

Keywords: COI, *Macrodon ancylodon*, *Macrodon atricauda*, Southern king weakfish, King weakfish.

1. Introdução

A identificação morfológica de animais e plantas, com base em características anatômicas, durante muitos anos foi a única ferramenta válida para se afirmar parentesco entre indivíduos, com isso mudando apenas após a popularização de outros métodos (HEBERT et al., 2003). No entanto, esse processo pode ocasionar erros de identificação a depender da interpretação do profissional que está analisando (MEIKLEJOHN et al., 2021). Para que esse tipo de identificação possa ser realizado de forma correta, é necessária a visualização de certas características do animal, como coloração, ou alguma estrutura em específico. Contudo, nem sempre é possível receber um espécime inteiro e em perfeito estado de conservação, livre de contaminações, lesões, e outras condições como o estágio de maturação do indivíduo que pode ser influenciado por pesca excessiva (CARDOSO et al., 2015), que podem criar alterações físicas e dificultar a identificação a nível de espécie do indivíduo analisado (MEIKLEJOHN et al., 2021).

Com o avanço de algumas tecnologias, novas possibilidades surgem para determinar com maior exatidão qual é a espécie do indivíduo a ser analisado. Uma dessas técnicas é a análise via DNA *Barcoding*, utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COI), que se tem mostrado um método eficaz para diversos grupos de organismos (HEBERT et al., 2003). Essa ferramenta de identificação molecular se demonstra extremamente importante, não apenas para ampliação de dados em aplicações ecológicas, mas também para fins econômicos e de saúde, como por exemplo no controle de qualidade de alimentos, a fim de prevenir contaminações ou falsificações (YANCY et al., 2007). Exemplo muito comum é na área alimentícia, que existe a impossibilidade de análise morfológica do animal utilizado no produto, como no caso de enlatados, embutidos ou em filés de pescado. No caso de filés de pescados congelados podem ser vendidas espécies semelhantes como sendo de espécies de maior valor comercial (BARBOSA et al., 2020). Organizações estrangeiras como a R.F.E. (*Regulatory Fish Encyclopedia*), ligadas a identificação e controle de frutos do mar, já utilizam análises moleculares para obter a confirmação das espécies comercializadas, e dar maior segurança sanitária e comercial para os consumidores e comerciantes destes produtos (YANCY et al., 2007).

Conhecidas popularmente como pescadinhas, *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) (Figura 1) e *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) (Figura 2) são espécies pertencentes a família Sciaenidae. A palavra que dá nome ao gênero *Macrodon* vem do grego (Makros = grande/longo + Odon = dente), nomeado devido ao fato dos peixes deste gênero terem como característica marcante dentes longos e afiados, que se projetam da boca do animal. Ambas as espécies divergiram entre si no Pleistoceno por volta de 1,5 milhões de anos atrás (ADERNE et al., 2022) e apresentam uma ampla distribuição ao longo da costa brasileira e da América Latina. De forma geral, essas espécies possuem grande importância ecológica e econômica, no que diz respeito ao seu uso como recursos pesqueiros, devido a sua fartura e acessibilidade. Embora se afirme que *Macrodon ancylodon* tem sua incidência registrada da Venezuela até a Argentina (MITITELLI et al., 2004), análises moleculares (SANTOS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014) e morfológicas (CARVALHO-FILHO et al., 2010), sugerem que a população de *M. ancylodon* na região sul, até então tratada como uma população com características distintas da presente nas regiões mais ao norte, seja, na verdade, a espécie *M. atricauda*. Essa espécie seria responsável pelos registros ao longo da costa do estado do Espírito Santo até a Argentina, muitas vezes também sendo referida como um grupo subtropical, enquanto a população que se encontra distribuída entre a Venezuela e o estado da Bahia seria composta por indivíduos da espécie *M. ancylodon*, anteriormente tratada como grupo tropical. As regiões próximas de Mucuri (BA) e Conceição da Barra (ES) são consideradas zonas de contato, ou seja, áreas de encontro entre ambas as espécies (ADERNE et al., 2022).

As diferenças anatômicas que são utilizadas para identificar a espécie são principalmente diferenças de tamanho entre as nadadeiras, raios dorsais e dentição, além da contagem de número de escamas (CARVALHO-FILHO et al., 2010) e análise dos otólitos (CARDOSO et al., 2012).



Figura 1. Exemplar de *Macrodon ancylodon* (Carvalho-Filho, 1995).



Figura 2. Exemplar de *Macrodon atricauda* (Carvalho-Filho et al., 2010).

2 - Objetivos

Objetivo geral

Ampliar as discussões sobre a identificação das espécies *Macrodon ancylodon* e *Macrodon atricauda* no Espírito Santo.

Objetivo específico

Confirmar a identificação de amostras de pescadinhas morfologicamente identificadas como *Macrodon ancylodon*, *M. atricauda*, *Macrodon* sp e *Isopisthus parvipinnis*, utilizando o DNA Barcoding como ferramenta.

3 - Metodologia

3.1 - Coleta

O material foi coletado de forma legal com licença em parceria com o Laboratório de Pesca e Aquicultura - LABPESCA e Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos - LEPMAR, localizados no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) na UFES. As amostras referentes ao Espírito Santo foram adquiridas a partir do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) e de visitas a desembarques pesqueiros, enquanto as amostras referentes às coletas no litoral do São João da Barra, RJ, foram realizadas por compra direta com pescadores em desembarques. As amostras foram coletadas durante os anos de 2018 a 2024 com redes de emalhes nos rios Barra Nova, Barra Seca, Caravelas, Doce, Ipiranga, Piraquê-Açú, São Mateus e Iriri, no ES, e São João da Barra, no RJ (Figura 3).

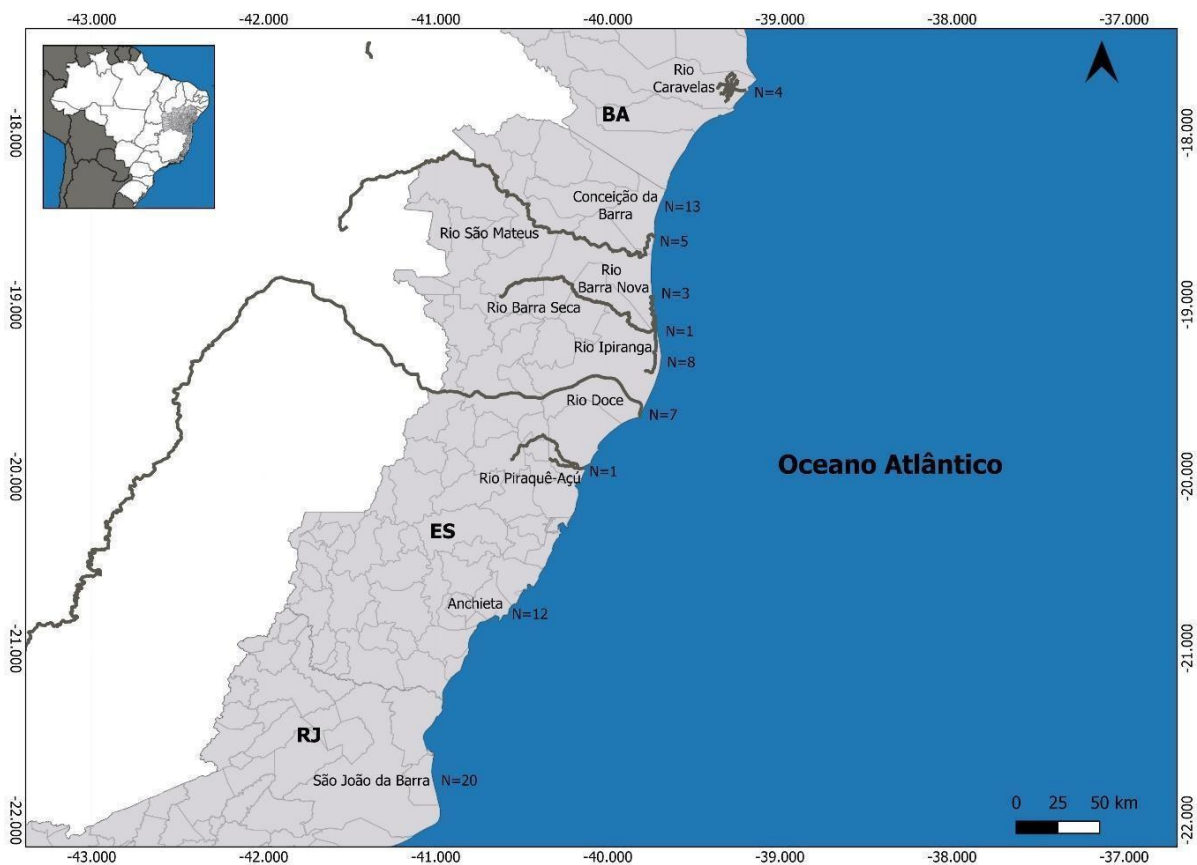


Figura 3. Locais das coletas dos peixes morfologicamente identificados como *Macrodon ancylodon* (n=43), *M. atricauda* (n=10), *M. sp* (n=18) e *Isopisthus parvipinnis* (n=3). Mapa gerado a partir do programa QGIS 3.38.0.

A identificação morfológica dos espécimes coletados foi realizada por um único profissional a fim de evitar erros de identificação por discordância de interpretação de dados, utilizando a chave de identificação de CARVALHO-FILHO et al. (2010). As amostras MACSP20-SJ; MACSP21-SJ; MACSP23-SJ e MACSP26-SJ não puderam ser morfologicamente identificadas, devido ao fato de terem sido entregues apenas as cabeças dos indivíduos para análise. No entanto, foi realizada a identificação molecular destes indivíduos.

3.2 - Extração do DNA e quantificação

Para extração do DNA foi utilizado o método de extração salina (BRUFORD et al., 1992, adaptado por David Vieites). Nesse método, o tecido foi picotado com auxílio de um bisturi e colocado dentro de um microtubo, adicionando uma solução de lise aos tubos (410 µL de buffer de extração + 80 µL SDS 10% + 15 µL proteinase K (20 µ/µL). Os microtubos foram deixados *overnight* para a digestão do tecido em banho seco. Em seguida, a solução dos microtubos foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionamos 180 µL NaCl (5 M). O tubo foi invertido 50 vezes, centrifugado a 13.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e 1.000 µL de isopropanol gelado foi adicionado, misturado gentilmente e centrifugado a 13.000 rpm por 7 minutos, descartado o sobrenadante, adicionados 250 µL de etanol 80% e invertido 50 vezes para se misturar. Foram realizados novamente os passos da centrifugação a 7 min em diante. O sobrenadante foi descartado, o álcool removido, o DNA foi ressuspendido em 50-100 µL de água ultrapura, e deixado na geladeira *overnight* em 4°C para diluir o pellet. A concentração e a pureza do DNA foram medidas, através de 1 µL do DNA extraído, utilizando-se um espectrofotômetro.

3.3 - Amplificação por PCR

Para a amplificação do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), foram utilizados os seguintes primers: FishF1- 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR2- 5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (Ward et al., 2005). As reações foram preparadas para 20 µL, usando 0,625 U de Taq DNA Polimerase; 0,104 µM de cada primer (10 mM), 2,6 µM de DNTP (10 mM); 2,6 µM de Tampão 10x; 2,6 mM de MgCl₂ (50 mM) e 20 ng/µl de DNA. As condições do termociclador foram de 95°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 1 min, por fim 72°C por 10 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose (1%) corados em *Gelred* e foto-documentados sob UV. Então as reações foram purificadas com o uso da enzima ExoSap-IT e logo após enviadas para sequenciamento em uma empresa terceirizada.

3.4 – Análise de dados

As sequências foram editadas e alinhadas manualmente com o auxílio das ferramentas "*Muscle*", a partir do programa MEGA 7.026 (KUMAR et al., 2016). As sequências geradas foram comparadas com sequências previamente publicadas em dois bancos de dados online, *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e *BOLD* (www.boldsystems.org). Após essa comparação, foi criada uma árvore de *Neighbor-Joining* (SAITOU et al., 1987) utilizando dez sequências diferentes baixadas dos bancos de dados genéticos, *GenBank* e *BOLD*, oito referentes à espécie *M. Ancylo don*, uma referente à *M. Atricauda* e uma referente à espécie *Cynoscion virescens* utilizada como grupo externo (Tabela 1). As sequências usadas para comparação obtidas nos bancos de dados genéticos foram escolhidas dando preferência para sequências que já publicadas em artigos científicos, para maior confiabilidade, com exceção da sequência referente à espécie *Cynoscion virescens*. A árvore foi criada no software MEGA 7.026 com base no modelo de substituição de parâmetros Kimura-2 (K2P) (KIMURA, 1980). Os ramos foram verificados com base dos valores do *Bootstrap* com 10.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

Tabela 1. Tabela com código de acesso, identificação molecular, e artigo vinculado das sequências obtidas nos bancos de dados *GenBank* e *BOLD*.

Código da sequência	Identificação molecular	Artigo
JQ365417.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al., 2012.
JQ365418.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al., 2012
JQ365419.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al., 2012
KP722734.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	LO, P. C. et al., 2015.
KP331678.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	BRITO, M. A. et al., 2015.
KP331679.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	BRITO, M. A. et al., 2015.
KP331680.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	BRITO, M. A. Et al., 2015.
KP331715.1	<i>Macrodon ancylodon</i>	BRITO, M. A. et al., 2015.
SCCAR053-12	<i>Macrodon atricauda</i>	DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al., 2012
ON695956.1	<i>Cynoscion virescens</i>	(artigo não publicado). ZHANG, 2022, Direct Submission.

4 - Resultados

A concentração de DNA das amostras extraídas variou de 4,0 a 1.232,4 ng/μl, com uma média de 228,69 ng/μl. O total de 74 sequências de COI apresentaram fragmentos amplificados em torno de 600 pb. Após serem alinhadas e editadas, variaram de 430 a 538 pb.

Das 74 amostras analisadas, três foram morfologicamente identificadas como

I. parvipinnis, dez como *M. atricauda*, 43 como *M. ancylodon* e 18 como pertencentes ao gênero *Macrodon*, porém sem confirmação da espécie (*Macrodon* sp.). Após a análise de barcoding, todas foram molecularmente identificadas como *M. ancylodon*, com base na comparação com sequências disponíveis nos bancos de dados genéticos *GenBank* e *BOLD*, com a compatibilidade variando entre 97,37% a 100% (Tabela 2).

É possível observar na tabela 2, incongruências entre os resultados das análises moleculares e morfológicas. Ao todo, 13 amostras apresentaram dissonância entre esses métodos, sendo dez amostras morfológicamente identificadas como *M. atricauda*, porém molecularmente como *M. ancylodon*, e três amostras morfológicamente identificadas como *I. parvipinnis*, porém molecularmente identificadas como *M. ancylodon*.

Das 74 amostras analisadas no *GenBank* e *BOLD*, 57 apresentaram 100% de correspondência em pelo menos um dos bancos utilizados e 40 apresentaram 100% de correspondência em ambos os bancos. No entanto, apenas 26 dessas amostras que tiveram 100% de correspondência em ambos os bancos de dados corresponderam à identificação morfológica.

Tabela 2. Nome das amostras, suas respectivas concentrações de DNA em ng/μl, sua identificação morfológica (*Macrodon ancylodon*, *Macrodon atricauda* e *Isopisthus parvipinnis*) e sua identificação molecular nos bancos de dados genéticos *GenBank* e *BOLD*.

Amostras	Concentração do DNA (ng/μl)	Identificação morfológica	Identificação molecular – GenBank	Identificação molecular – BOLD
MACANC1-CB	206,2	<i>M. ancylodon</i>	98,92% <i>M. ancylodon</i>	98,90% <i>M. ancylodon</i>
MACANC2-CB	173,8	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC3-CB	124,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC4-CB	242,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC5-IRIRI	168,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC7-IRIRI	49,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC9-IRIRI	111,4	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>

MACANC15-IRIRI	81,9	<i>M. ancyllodon</i>	99,62% <i>M. ancyllodon</i>	99,80% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC17-IRIRI	92	<i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC18-IRIRI	241,6	<i>M. ancyllodon</i>	99,30% <i>M. ancyllodon</i>	99,52% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC19-IRIRI	174,3	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC20-IRIRI	179,7	<i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>	99,80% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC21-IRIRI	129	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC22-IRIRI	252,3	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC23-IRIRI	209,9	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC24-IRIRI	232,4	<i>M. ancyllodon</i>	98,97% <i>M. ancyllodon</i>	98,95% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC25-CB	131,7	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC26-CB	47,6	<i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC27-CB	5,7	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC28-CB	73,1	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC29-CB	52,4	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC30-CB	18,8	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC33-CB	24,8	<i>M. ancyllodon</i>	99,78% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC34-CB	14,5	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC37-CB	10,3	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC52-IP	323,7	<i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC53-IP	244,6	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC54-IP	387,1	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC55-CA	1232,4	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC56-CA	1215,7	<i>M. ancyllodon</i>	99,63% <i>M. ancyllodon</i>	99,80% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC57-CA	1186,8	<i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>	99,81% <i>M. ancyllodon</i>
MACANC58-IP	151,6	<i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>	100% <i>M. ancyllodon</i>

MACANC59-IP	101,3	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC60-SM	150,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC61-SM	304,6	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC62-SM	181,1	<i>M. ancylodon</i>	99,81% <i>M. ancylodon</i>	99,81% <i>M. ancylodon</i>
MACANC63-SM	207,5	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC64-BS	91,06	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC65-SJ	12,1	<i>M. ancylodon</i>	98,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC66-SJ	38,9	<i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC67-SJ	15,5	<i>M. ancylodon</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC68-SJ	8,5	<i>M. ancylodon</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACANC69-SJ	54,1	<i>M. ancylodon</i>	99,68% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR-1DO	285,8	<i>M. atricauda</i>	99,81% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR2-DO	186,4	<i>M. atricauda</i>	99,81% <i>M. ancylodon</i>	99,81% <i>M. ancylodon</i>
MACATR4-DO	4,0	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR5-IP	275,2	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR6-PA	27,4	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR7-IP	110,8	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR8-CA	353,1	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR9-BN	401,3	<i>M. atricauda</i>	98,88% <i>M. ancylodon</i>	98,86% <i>M. ancylodon</i>
MACATR10-SM	530,5	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACATR11-SM	443,7	<i>M. atricauda</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP3-IP	118,5	<i>Macrodon sp.</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP4-DO	49,4	<i>Macrodon sp.</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP6-BN	121,4	<i>Macrodon sp.</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>

MACSP8-SJ	13,8	<i>Macrodon sp.</i>	99,71% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP10-SJ	51,2	<i>Macrodon sp.</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP11-SJ	11,9	<i>Macrodon sp.</i>	97,37% <i>M. ancylodon</i>	98,94% <i>M. ancylodon</i>
MACSP12-SJ	85,6	<i>Macrodon sp.</i>	99,71% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP13-SJ	11,9	<i>Macrodon sp.</i>	99,27% <i>M. ancylodon</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>
MACSP14-SJ	65,7	<i>Macrodon sp.</i>	99,70% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP15-SJ	97,8	<i>Macrodon sp.</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP16-SJ	8,6	<i>Macrodon sp.</i>	99,70% <i>M. ancylodon</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>
MACSP17-SJ	49	<i>Macrodon sp.</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP18-SJ	21,6	<i>Macrodon sp.</i>	98,32% <i>M. ancylodon</i>	99,20% <i>M. ancylodon</i>
MACSP19-SJ	63,1	<i>Macrodon sp.</i>	98,87% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
MACSP20-SJ	63	X	99,41% <i>M. ancylodon</i>	99,84% <i>M. ancylodon</i>
MACSP21-SJ	39,9	X	99,39% <i>M. ancylodon</i>	99,84% <i>M. ancylodon</i>
MACSP23-SJ	39,1	X	99,56% <i>M. ancylodon</i>	99,85% <i>M. ancylodon</i>
MACSP26-SJ	35,8	X	99,84% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
ISOPAR78-DO	277,3	<i>I. parvipinnis</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
ISOPAR80-DO	278,7	<i>I. parvipinnis</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>
ISOPAR131-DO	59,7	<i>I. parvipinnis</i>	100% <i>M. ancylodon</i>	100% <i>M. ancylodon</i>

Na árvore de Neighbor-Joining, foi possível observar três agrupamentos distintos. O primeiro apresentou um único indivíduo do grupo considerado externo, enquanto os outros dois agrupamentos contêm as sequências deste estudo juntamente com amostras obtidas no GenBank e BOLD (Figura 4).

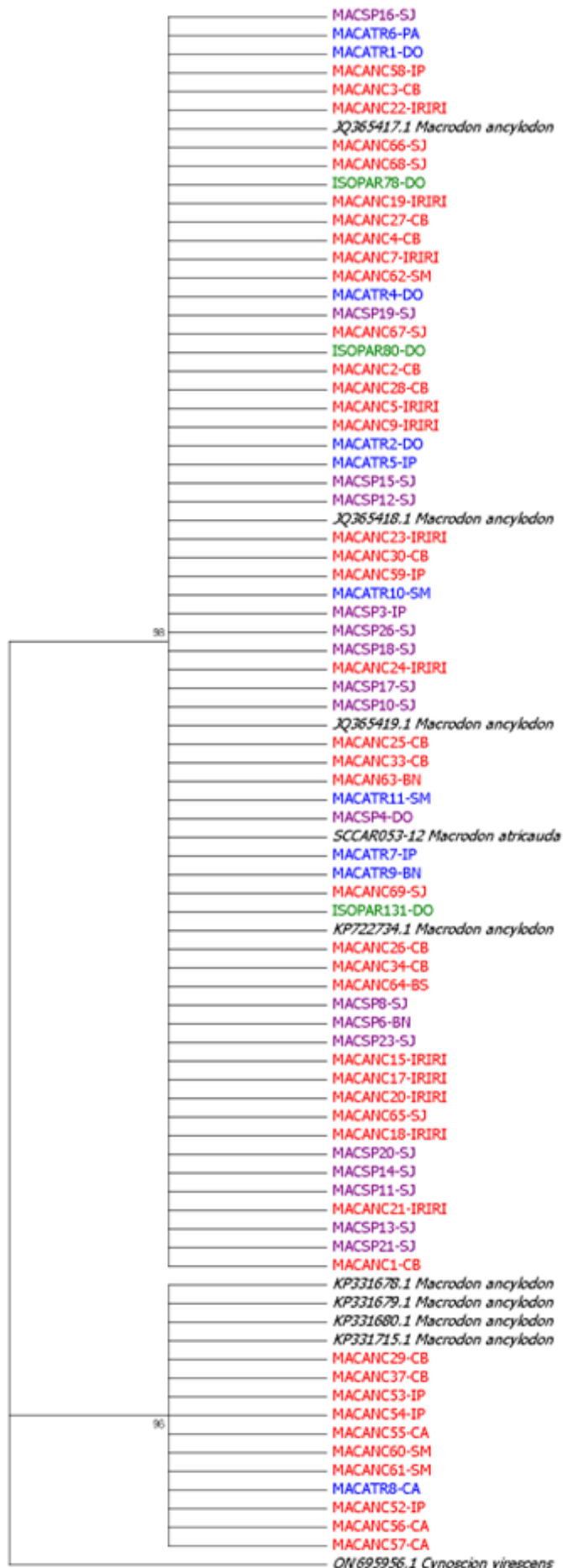


Figura 4: Árvore de *Neighbor-Joining* com sequências deste estudo e sequências obtidas no *GenBank* e *BOLD*, para fins de comparação. As amostras em itálico e preto representam as sequências obtidas no *GenBank* e *BOLD*, as sequências em vermelho correspondem às amostras morfológica e geneticamente identificadas como *Macrodon ancyloдон*, as azuis como *Macrodon atricauda*, as roxas a amostras identificadas apenas como pertencentes ao gênero *Macrodon*, e as verdes a amostras morfológica e geneticamente identificadas como *Isopisthus parvipinnis*.

5 - Discussão

Ao analisarmos a tabela contendo as identificações morfológicas e moleculares das amostras, podemos observar que independentemente das identificações morfológicas, todas as amostras foram molecularmente identificadas por ambos os bancos de dados como pertencentes a espécie *M. ancylodon*, apresentando em sua maioria (57 amostras), 100% de compatibilidade em pelo menos um dos bancos de dados utilizados. Esses resultados sugerem que todas as amostras pertencem à mesma espécie. No entanto, na Árvore de *Neighbor-Joining* essas sequências não formaram um único agrupamento, ficando de fora o grupo externo e a sequência da espécie *Macrodon atricauda* adquirida no GenBank, como o esperado. Ao analisar a árvore gerada, podemos observar a formação de dois grupos, um contendo uma única amostra morfológica identificada como sendo *M. atricauda*, porém molecularmente identificada como *M. ancylodon*, agrupada juntamente com amostras molecular e morfológica identificadas como *M. ancylodon* e sequências do GenBank e BOLD molecularmente identificadas como *M. ancylodon*. O outro grupo formado, reuniu as demais sequências deste estudo que consistem em amostras morfológica identificadas como *M. sp*, *M. ancylodon*, *M. atricauda* e *I. parvipinnis*, mas molecularmente identificadas como *M. ancylodon*, assim como amostras molecularmente identificadas como sendo *M. ancylodon* e *M. atricauda* obtidas no Genbank e BOLD. A existência de mais de um agrupamento na árvore demonstra que existe uma distância genética significativa entre as amostras, o que contradiz os resultados entregues pelos bancos de dados utilizados, que identificaram todas as amostras como pertencentes à mesma espécie.

Como podemos observar na Figura 5, existe uma clara demarcação da área de transição dos grupos presentes na Árvore, sendo Conceição da Barra ao Rio Ipiranga o locais onde são possíveis encontrar indivíduos de ambos os grupos, e Conceição da Barra o limite onde é possível encontrar indivíduos do ramo maior da Árvore de *Neighbor-Joining*, e o Rio Ipiranga o limite onde é possível encontrar indivíduos do ramo menor da Árvore. Essa marcação clara demonstra que existe um limite de incidência das espécies presentes na Árvore, estes limites coincidem com os limites próximos propostos por ADERNE et al. (2022), que propõe áreas de transição entre Mucuri-BA e Conceição da Barra-ES. Utilizando os padrões deste autor e comparando

com as informações presentes na Árvore de *Neighbor-Joining* gerada, seriam os indivíduos abaixo do Rio Doce considerados *M. atricauda*, e indivíduos do Rio Caravelas para cima considerados *M. ancylodon*, e tendo indivíduos de ambos os grupos entre o Rio Ipiranga e Conceição da Barra.

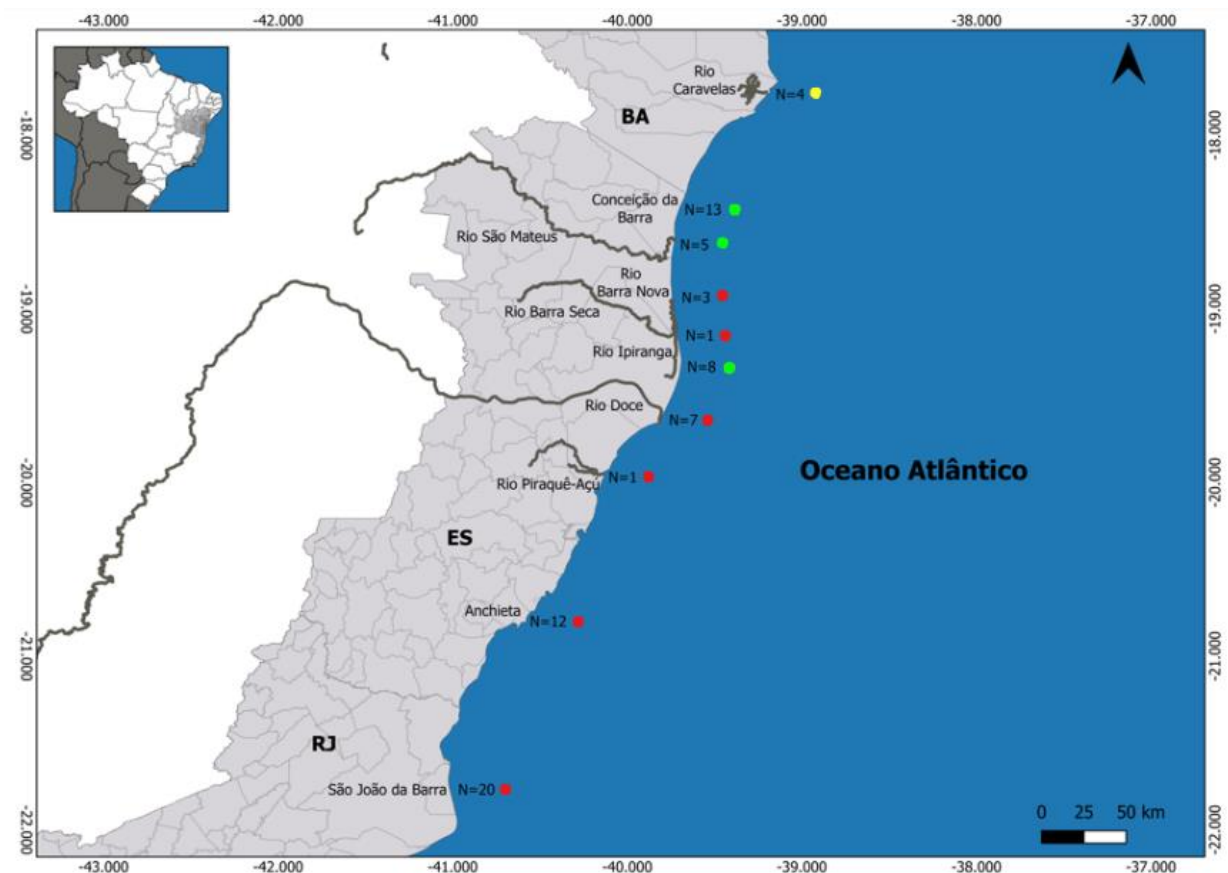


Figura 5. Locais das coletas dos peixes. Vermelho: todas as amostras do local alinhadas com o ramo superior (maior) da Árvore de *Neighbor-Joining*. Amarelo: todas as amostras do local alinhadas com o ramo inferior (menor) da Árvore de *Neighbor-Joining*. Verde: amostras do local alinhadas em ambos os ramos (grupos) da Árvore de *Neighbor-Joining*. Mapa gerado a partir do programa QGIS 3.38.0. e modificado.

Ao observarmos os agrupamentos na árvore gerada é possível visualizar que existem amostras morfológicamente identificadas como *M. atricauda* e *M. ancylodon*, mas sendo todas molecularmente identificadas como *M. ancylodon* em ambos os ramos formados. Além disso, o fato das sequências obtidas no GenBank e BOLD estarem se agrupando em ambos os ramos formados, demonstra que existe uma diferença molecular entre as próprias sequências utilizadas como base de

comparação. Embora essas sequências tenham sido publicadas em artigos científicos revisados por pares, elas possuem divergências entre si. Sendo assim, não podemos ter a certeza de qual dos ramos verdadeiramente representa *M. ancylodon*. Amostras com a mesma identificação morfológica, molecular, e de mesma localidade, ainda assim, não foram agrupadas na Árvore. ex: MACANC1-CB e MACANC37-CB. Isso demonstra que existe não apenas um problema nas identificações morfológicas de ambas as espécies, como também que esse problema se estende aos dados moleculares depositados em bancos genéticos (sequências depositadas).

Essa falta de concordância entre as sequências dos bancos provavelmente é resultado do período em que a espécie *M. atricauda* era tratada como sinônimo da espécie *M. ancylodon*, podendo ter gerado uma sobreposição de informação referente a ambas as espécies. Para algumas análises e aplicações, isso se torna especialmente problemático, como na utilização desses dados para determinarmos a distribuição da espécie, estrutura populacional, verificar o impacto da pesca e sugerir manejos adequados.

Dados evidenciando as diferenças morfológicas (CARVALHO-FILHO et al., 2010) e genéticas (SANTOS et al., 2006) de cada espécie começaram a ganhar maior relevância nos últimos anos. Quando se busca por informações anteriores aos artigos que evidenciam as diferenças entre as espécies (SANTOS et al., 2006; CARVALHO-FILHO et al., 2010), é possível observar que para a espécie *M. atricauda*, além de não mencionada informações referentes a ela, como sua incidência em águas frias ao sul do continente Sul Americano, e citada como sendo *M. ancylodon*. O trabalho de SANTOS et al. (2006) ressaltou uma diferença genética entre as populações do Norte e do Sul da América do Sul, porém sem afirmar que a população ao sul seria referente a espécie *M. atricauda*, apenas mencionando-a como sendo uma população subtropical. Outro exemplo desta situação é o trabalho de MITITELLI et al. (2013), que trata sobre a desova de Cienídeos na costa de Buenos Aires, Argentina, onde não há menção da espécie *M. atricauda*, porém se afirma a presença da espécie *M. ancylodon* em locais de habitação da *M. atricauda*, fazendo uma clara substituição. Tal fato nos dá a entender que ambas foram tratadas como sendo a mesma espécie neste caso, fazendo com que seja necessária cautela em observar como cada artigo apresenta seus dados em relação a essas espécies, principalmente em relação à distribuição onde se há uma sobreposição de informações mais evidente.

Em especial, para a identificação de *Macrodon*, o tamanho dos dentes é

essencial (CARVALHO-FILHO et al., 2010). Um problema que dificulta imensamente a identificação morfológica de peixes, é a queda de escamas e dentes. O instrumento utilizado e o tipo de pesca (passivo onde se espera o peixe vir ao instrumento de pesca sem a necessidade de um esforço do coletor para isso, ou ativo onde se utiliza de um esforço com o instrumento de pesca, com o intuito de capturar o peixe durante o manuseio), manuseio do pescador durante a pesca, o transporte do pescado até o laboratório e o seu armazenamento são etapas que podem danificar o indivíduo capturado, como causar a queda ou quebra dos dentes e escamas, o que dificulta e atrasa imensamente a identificação morfológica. Além disso, a intensificação nas atividades pesqueiras afeta não apenas a quantidade de indivíduos disponíveis nos estoques pesqueiros, como também afeta a idade de maturidade e o tamanho do pescado (CARDOSO et al., 2015), o que pode dificultar identificações. Dito isso, identificações morfológicas demonstram ser uma tarefa árdua.

O Espírito Santo é uma área de transição (ADERNE et al., 2022), sendo assim uma região de encontro entre ambas as espécies, sendo possível encontrá-las habitando o mesmo local. Embora as espécies de *Macrodon* tenham preferências por águas com diferentes temperaturas, já se possui registro de mudanças climáticas influenciando deslocamento de espécies para ambiente mais adequados a suas preferências de habitat (GIANELLI et al., 2023), além de eventos esporádicos relacionados a fluxo de correntes, que podem carregar biota de outros ambientes com diferenças de temperatura e salinidade (MERRITT et al., 1998).

Outra possibilidade a ser considerada, que pode dificultar a apuração de dados morfológicos e genéticos, é a possível formação de híbridos. Ambas as espécies possuem hábitos de vida semelhantes, sendo peixes demersais costeiros, que habitam áreas estuarinas até sua maturação sexual, tendo sua alta de desova entre outubro a maio (YAMAGUTI, 1967; MILITELLI et al., 2004; CAMARGO et al., 2005). Não seria impossível haver algum tipo de hibridização entre populações que habitam o mesmo espaço. Embora SANTOS et al. (2006) tenham demonstrado, utilizando marcadores de DNA mitocondrial citocromo b, que não há um fluxo gênico entre populações tropicais e subtropicais de *Macrodon*, não existem estudos com dados suficientes sobre populações de *M. atricauda* e *M. ancylodon* que compartilham o mesmo ambiente, tendo em vista que até muito recentemente elas eram consideradas a mesma espécie.

Assim, considerando os pontos observados, sobre as semelhanças morfológicas, o encontro de ambas as espécies em determinadas regiões, e o histórico de pesquisas a qual tratavam a espécie *M. atricauda* como sendo sinônimo da *M. ancylodon*, não seria improvável que determinadas sequências inseridas nos bancos de dados genéticos como *GenBank* ou *BOLD* tenham sido de espécimes identificados erroneamente. Desta forma, estudos futuros como análises a nível populacional, trazendo novas informações são cruciais para um maior entendimento do tema. Estudos a médio e longo prazo relacionados a seres vivos, principalmente daqueles que estão mais suscetíveis a alterações humanas, ou que possuam importância econômica e social, como é o caso das pescadinhas, animais utilizados como recursos pesqueiros, são essenciais.

6 – Conclusões

Devido a região do Espírito Santo ser uma zona de encontro entre ambas as espécies do gênero *Macrodon* aqui abordadas, as semelhanças morfológicas e as sequências usadas como base para a identificação tornam a uma tarefa desafiadora, exigindo cautela. No entanto, com base nos dados apresentados, existe a presença de dois grupos distintos de *Macrodon* no Espírito Santo com distância genética considerável, se tratando provavelmente de duas espécies diferentes. Além disso, devido à falta de coesão entre as sequências obtidas nos bancos de dados genéticos, não foi possível uma identificação precisa, destacando que ainda existem dificuldades e desafios a serem superados para solucionar a questão da identificação das espécies *M. ancylodon* e *M. atricauda*.

7 - Referências

ANDRESSA JISELY BARBOSA, et al. (2020). Molecular authentication by DNA barcoding and multiplex PCR assay reveals mislabeling and commercial fraud of the Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*), an economically important sciaenid marketed in Brazil, Food Control, Volume 117.

ALEXANDRE FALCÃO ADERNE, et al. (2022). "Allopatric divergence and secondary

contact of two weak fish species (*Macrodon ancylodon* and *Macrodon atricauda*) from the South Atlantic.” Fisheries Research Volume 245, January.

BRITO, M. A. et al. (2015). “DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*)”. Food Research International.

BRUFORD, M. et al. (1992). “Single-locus and DNA fingerprinting. In Hoelzel, A.R. Ed. Oxford: Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach.” IRL Press, p225–269.

CARVALHO-FILHO, A.; SANTOS, S.; SAMPAIO, I. (2010). “*Macrodon atricauda* (Günther, 1880) (Perciformes: Sciaenidae), a valid species from the southwestern Atlantic, with comments on its conservation”. Zootaxa, 2519: 48- 58.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al. (2012). “DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil”. Molecular Ecology Resources.

FELSENSTEIN, J. (1985) “The American Naturalist: Phylogenies and the Comparative Method.” The American Naturalist Vol. 125, No. 1. The University of Chicago Press.

GIANELLI, I et al. (2023). “Sensitivity of fishery resources to climate change in the warm-temperate Southwest Atlantic Ocean”. Reg. Environ. Change 23, 49.

HAILE F. YANCY et al. (2007). “Potential Use of DNA Barcodes in Regulatory Science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia. Journal of Food Protection”, Vol. 71, No. 1.

HANDY S. M. et al. (2011) “A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance.” Journal of AOAC INTERNATIONAL, 94(1), 201–210.

HEBERT et al. (2003) "Biological identifications through DNA barcodes" Proc Biol Sci.

KELLY A. MEIKLEJOHN et al. (2021). "Current methods, future directions and considerations of DNA-based taxonomic identification in wildlife forensics". Forensic Science International: Animals and Environments Volume 1.

KIMURA, M. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." J Mol Evol 16, 111-120.

KUMAR, S. et al. MEGA X: "molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms." v35n(6), Molecular biology and evolution. p1547-1549.

LO, P. C. et al. (2015). "A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae)". Mol Phylogenet Evol.

LUIS GUSTAVO CARDOSO et al. (2012). "Differences in the otoliths support the distinction of the genus *Macrodon* into two species in the south-western Atlantic Ocean". Marine Biodiversity Records.

LUÍS GUSTAVO CARDOSO et al. (2015). "Long-term changes in the age structure, mortality and biomass of the king weakfish *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) in southern Brazil: Is it resilient enough to avoid collapse?". Fisheries Research, Volume 167.

MAURICIO CAMARGO & VICTORIA ISAAC. (2005). "Reproductive biology and spatio-temporal distribution of *Stellifer rastrifer*, *Stellifer naso* and *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae) in the Caeté estuary, northern Brazil". Brazilian journal of Oceanography.

MERRIT, R. et al. (1998). "How do cold water biota arrive in a tropical bay near Rio de Janeiro, Brazil?". Continental Shelf Research, Volume 18, Issue 13.

MITITELLI et al. (2004). "Spawning and fecundity of king weakfish, *Macrodon ancylodon*, in the Río de la Plata estuary, Argentina, Uruguay". Journal of the Marine Biological Association of the UK.

MITITELLI et al. (2013). "Influence of environmental factors on the spawning of sciaenids in the Buenos Aires Coastal Zone, Argentina". Ciencias Marinas. 39. 55-68.

N. YAMAGUTI. (1967). "Desova da pescada-foguete, *Macrodon ancylodon*". Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

ROSA RODRIGUES et al. (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.

SAITOU, N. et al. (1987). "The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." The University of Chicago.

SIMÔNI SANTOS et al. (2006). "Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change." Molecular Ecology.

VERGARA-CHEN et al. (2009). "A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the *Cynoscion* group (Pisces: Sciaenidae)". Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009.

WARD, R. D. et al. (2005). "DNA barcoding Australia's fish species." v360n (1462), Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences. p1847- 1857.

(Artigo não publicado). ZHANG, J. (2022). Submitted (07-JUN-2022) Jinan University, Research Center for Traditional Chinese Medicine of Lingnan, Xingye Avenue East, Guangzhou, Guangdong 510632, China.