

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

TESTANDO A MONOFILIA DE PACHYURINAE (PERCIFORMES, SCIAENIDAE) E DE
SEUS COMPONENTES COM BASE EM DOIS GENES MITOCONDRIAIS

Curitiba
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

TESTANDO A MONOFILIA DE PACHYURINAE (PERCIFORMES, SCIAENIDAE) E DE
SEUS COMPONENTES COM BASE EM DOIS GENES MITOCONDRIAIS

Aluna: Leticia de Bittencourt Zagonel
Acadêmica do curso de Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Walter A. P. Boeger, Ph.D.
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Zoologia

Co-orientador: M. Sc. Marcio R. Pie
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Zoologia

Curitiba
2006

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, tornando-o possível. Agradeço ao meu orientador Prof. Walter A. P. Boeger e co-orientador Marcio R. Pie por toda a ajuda, dedicação e paciência concedida.

A todos os colegas e amigos do laboratório (incluindo orientador e co-orientador), pelos bons momentos proporcionados, seja nos “happy hours” de sexta-feira (...), nos almoços no “My little corner” ou no “Celacanto”. E mesmo no próprio decorrer do dia de trabalho, em meio à boas (e nem tão boas) piadas, e àquelas músicas guauchescas que insistem em tocar.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Rodrigo A. Torres, por ter sido quem me introduziu neste campo de trabalho, me ensinando todos os procedimentos moleculares de que precisava para seguir em frente.

Agradeço também às pessoas que ajudaram nas coletas, em especial àquelas que enviaram material de outros estados, sem os quais este trabalho não seria o mesmo.

ÍNDICE

Resumo.....	01
Introdução.....	02
Material e Métodos	
Coleta de dados.....	06
Procedimento molecular.....	06
Análises filogenéticas.....	08
Resultados	
Análises com o gene 16S rRNA.....	09
Análises com o gene citocromo b.....	12
Análises conjuntas dos fragmentos dos genes 16S rRNA e citocromo b.....	14
Discussão.....	17
Referências Bibliográficas.....	20

RESUMO

As espécies de Sciaenidae (Perciformes), comumente conhecidas por corvina, pescada-branca, betara, dentre outros, são organismos que possuem grande importância comercial e de subsistência. Distribuem-se por toda a região tropical e subtropical do mundo, em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce. A família Sciaenidae é composta por aproximadamente 70 gêneros dos quais quatro são exclusivos de água-doce da América do Sul: *Pachyurus*, *Pachypops*, *Petilipinnis* e *Plagioscion*. Os três primeiros formam a sub-família Pachyurinae, objeto de estudo deste trabalho. Casatti (2000) propôs a única hipótese filogenética existente para as espécies desta sub-família, sugerindo a monofilia do grupo, baseada em dados morfológicos. De acordo com essa hipótese, a invasão do ambiente continental se deu uma única vez pelo ancestral de Pachyurinae. Boeger (comunicação pessoal) encontrou evidências baseadas em parasitos que podem sugerir uma nova hipótese filogenética para a sub-família: a de não-monofilia. Assim, os genes mitocondriais 16S rRNA e citocromo b foram utilizados com o objetivo de testar a monofilia e as relações filogenéticas existentes entre as espécies desta sub-família. A matriz utilizada foi composta por novas seqüências de espécies de paquiuríneos de diversas bacias hidrográficas brasileiras, além de representantes marinhos. Seqüências dos grupos externos (*Centropomus undecimalis* e *Epinephelus coioides*) foram obtidas no site do GenBank. A análise foi realizada com o programa PAUP* 4b10 e Mr Bayes v3.0B4. Os resultados das análises filogenéticas sugerem tanto a monofilia quanto a não-monofilia de Pachyurinae e ambos são suportados por elevados valores de bootstrap e/ou probabilidade posterior. As espécies de *Petilipinnis* e *Pachypops* sempre aparecem inseridas dentro do clado de *Pachyurus*, com elevados valores de suporte das referidas estatísticas. Portanto, considerá-los como gêneros válidos torna *Pachyurus* um gênero não monofilético. Os resultados do presente trabalho não são consistentes com estudos prévios sobre a filogenia dos Pachyurinae, nas quais os gêneros que compõe a sub-família são todos monofiléticos.

TESTANDO A MONOFILIA DE PACHYURINAE (PERCIFORMES, SCIAENIDAE) E DE SEUS COMPONENTES COM BASE EM DOIS GENES MITOCONDRIAIS

INTRODUÇÃO

Sciaenidae é uma família de Perciformes que inclui peixes popularmente conhecidos como corvina, pescada, betara, maria-luísia, pescadinha, goete, dentre outros, variando de acordo com a região. Muitas espécies dessa família são consideradas um excelente recurso pesqueiro, de grande importância comercial, além de muito utilizadas em comunidades de pescadores para garantia da própria subsistência. Sciaenidae é composta por aproximadamente 70 gêneros e 270 espécies, as quais se distinguem das demais por apresentarem o conjunto das seguintes características: “parte espinhosa anterior da nadadeira dorsal contínua com a parte mole posterior, havendo entre ambas um entalhe profundo (com exceção de *Isopisthus*, onde as duas partes são separadas); nadadeira anal com um ou dois espinhos; linha lateral estendendo-se até a margem posterior da nadadeira caudal” (Menezes & Figueiredo, 1980). A família possui representantes distribuídos por toda a região tropical e subtropical do mundo, ocorrendo em ambientes de água doce, estuarinos e marinhos costeiros, incluindo os oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Froese & Pauly, 2006).

Existem apenas seis gêneros que apresentam espécies exclusivamente de água doce, sendo eles *Aplodinotus* Rafinesque, 1819, *Boesemania* Bleeker, 1858, *Plagioscion* Gill, 1861, *Pachypops* Gill, 1861, *Pachyurus* Agassiz, 1831 e *Petilipinnis* Jardine & Schomburgk, 1843 (Froese & Pauly, 2006; Casatti, 2000). Espécies de *Aplodinotus* têm sua distribuição restrita à América do Norte e América Central (Page & Burr, 1991), enquanto as espécies de *Boesemania* ocorrem na Ásia, da Tailândia ao Vietnã e em Sumatra (Sasaki, 2001). Já as espécies dos outros quatro gêneros são encontradas no continente Sul Americano: *Plagioscion* distribui-se nas Guianas, rios costeiros do Suriname, nas bacias dos rios Amazonas e Magdalena, na Venezuela (Rio Orinoco), Peru, Brasil e Paraguai (Robins *et al.*, 1991; Eschmeyer, 2003; Casatti, 2003; Aguilera & Aguilera, 2001; Gómez & Chebez, 1996), *Pachypops* ocorre mais restritamente ao norte da América do Sul, na região das Bacias dos rios Orinoco e Amazonas e Bacia das Guianas (Casatti, 2000; Ferreira *et al.*, 1996), *Petilipinnis* distribui-se ao longo da Bacia Amazônica e das Bacias dos Rios Cuyuni e Essequibo na Venezuela e na Guiana Inglesa (Casatti, 2003), e *Pachyurus* tem ocorrência ao longo de quase todo o continente, desde o norte, nas Bacias dos rios Orinoco e Amazonas, passando pelas bacias dos rios São Francisco, Tocantins, Mucuri, Doce, Paraíba do Sul, até regiões mais ao Sul chegando aos Rios do Sistema Paraná-Paraguai-Uruguaí. Também pode ser encontrado na Colômbia e leste do

Equador, nos rios Napo e Aguarico (Casatti & Chao, 2002; Ortega & Vari, 1986; Casatti, 2003; Robins *et al.*, 1991; McAllister, 1990).

Segundo Sasaki (1989) e Casatti (2000), as espécies dos quatro gêneros Sul Americanos não formam um grupo natural, pois *Plagioscion* pertence a uma linhagem diferente dos outros três gêneros. Sasaki (1989) sugeriu a criação da sub-família Pachyurinae para abrigar os gêneros *Pachypops* e *Pachyurus*. Após Casatti (2001) ter proposto o novo gênero *Petilipinnis* para *Corvina grunniens* Schomburgk, 1843, e re-descrito *Petilipinnis grunniens*, a autora propôs a inclusão desta espécie, única para o gênero *Petilipinnis*, na sub-família Pachyurinae.

No intuito de compreender os padrões de evolução de um determinado grupo, assim como seus padrões biogeográficos, se faz necessário primeiramente o entendimento das relações filogenéticas existentes entre os táxons (Lovejoy, 2001). Padrões biogeográficos de transição entre ambientes marinhos e de água-doce podem ser prontamente explicados a partir destas relações. A única filogenia atualmente disponível das espécies de Pachyurinae foi proposta por Cassati (2000), a qual utilizou dados morfológicos para sugerir a hipótese de monofilia desta sub-família (Figura 1), assim como a dos gêneros que a compõe (Figura 2). Esta monofilia implica que a colonização do ambiente continental tenha ocorrido uma única vez pelo ancestral dos Pachyurinae. Segundo Boeger & Kritsky (2003), para espécies de *Plagioscion*, esta colonização parece ter ocorrido junto com transgressões marinhas no norte da América do sul, na região do Sistema Paleo-Amazonas-Orinoco (Lundberg *et al.*, 1998). Depois, houve dispersão destas espécies para o Sul por meio de um evento de captura de cabeceiras do Sistema Orinoco-Amazonas pelo Rio Paraná, o qual propiciou uma ligação temporária entre estas duas bacias, dando origem à fauna das bacias do Sul.

Um método bastante utilizado para reconstruir a história biogeográfica de certos grupos de animais é baseado na história evolutiva de seus parasitos (Brooks & McLennan, 1991). Na tentativa de reconstruir a história coevolutiva entre Pachyurinae e seus parasitos Monogenoidea, Fehlaue (2005) deparou-se com uma associação parasito-hospedeiro cuja compreensão dependeria do status da subfamília dos hospedeiros. *Pachyurus adpersus*, a única espécie de Pachyurinae conhecida de algumas das pequenas bacias atlânticas costeiras no Brasil é parasitada por uma única espécie de Monogenóideo Diplectanídeo, *Spinomatrix penteormos* Boeger & Fehlaue, 2006. Este parasito é grupo irmão de espécies parasitas de peixes marinhos, da subfamília Rhamnocercinae (Domingues & Boeger, 2006). Sendo assim, este parasito não é parte do clado de diplectanídeo que hipoteticamente colonizou o ambiente continental junto com o ancestral de Pachyurinae.

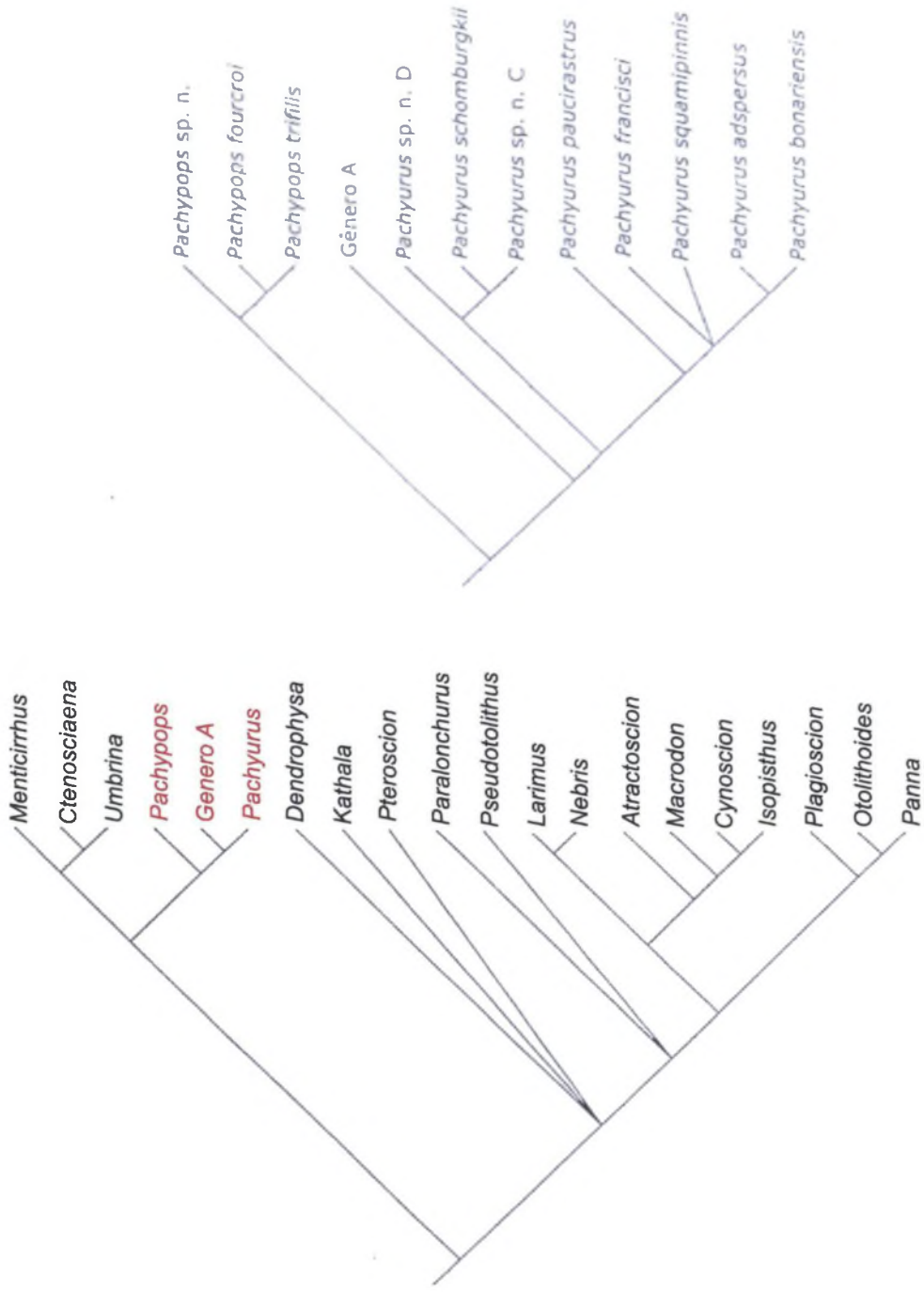


Fig. 1-2. Árvores filogenéticas proposta por Casatti (2000) nas quais a autora mostra o relacionamento entre alguns representantes de Sciaenidae, incluindo a monofilia de Pachyurinae (*Pachypops*, *Género A* = *Petilipinnis* e *Pachyurus* – todos em vermelho) (Fig 1); e as relações filogenéticas das espécies que representam a sub-família (Fig. 2).

Aceitando a hipótese de Casatti (2000), Fehlaer (2005) propõe que a linhagem de Diplectanidae que colonizou o ambiente continental com Pachyurinae foi extinta durante a dispersão desses peixes para as bacias do sul. Com o hospedeiro disponível, o ancestral de *S. penteormos* colonizou *P. adspersus*, oriundo de um ancestral parasito de um peixe marinho, em ambiente estuarino. Porém, outra hipótese compete com esta, sugerindo que Pachyurinae não seja monofilético, que *P. adspersus* não seja membro da subfamília e que a sua associação com *S. penteormos* seja histórica, resultado de coespeciação. O ancestral de *P. adspersus* teria, nesse cenário, colonizado o ambiente continental independentemente e trazido junto a si o ancestral de *S. penteormos*.

A reconstrução filogenética baseada em dados moleculares vem sendo aplicada de maneira ampla para responder questões de relacionamento entre organismos com os mais variados níveis de proximidade (Hillis *et al.*, 1996). Devido à alta taxa de mutação, os genes mitocondriais são uma boa opção nas análises filogenéticas entre táxons que apresentam tempo de divergência recente (Meyer, 1994), como ocorre no caso de espécies. Além disso, estes genes geralmente não sofrem recombinação, o que garante a manutenção das linhagens mitocondriais. Os métodos empregados vêm sendo extensivamente utilizados por diversos pesquisadores e vários genes já se encontram bem caracterizados para grupos de peixes como é o caso do citocromo b e do 16S rRNA (Santos *et al.*, 2003; Lovejoy & Collette, 2001; Craig *et al.*, 2001; Tsigenopoulos & Berrebi, 2000; Vinson *et al.*, 2004; Near *et al.*, 2003; Ortí & Meyer, 1997; Lovejoy & de Araújo, 2000).

Com o objetivo de testar a monofilia de Pachyurinae, assim como a de seus componentes, uma análise filogenética baseada em dados moleculares é proposta no presente trabalho, utilizando-se os genes mitocondriais 16S rRNA e citocromo b.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de dados

As coletas foram realizadas com ajuda de colaboradores nas seguintes bacias hidrográficas: Bacia Amazônica, Bacia do Tocantins, Bacia do Rio Paraíba do Sul, Bacia do Rio São Francisco e Bacia dos Rios Paraná-Paraguai-Uruguai. Espécies de cianídeos marinhos foram capturadas em Barra Velha – SC. Os locais de coleta e demais dados de campo estão apresentados na Tabela I. Todos os espécimes estão tombados em livro de registro do laboratório. As amostras de tecido obtidas das brânquias, fígado e músculo foram fixadas em etanol absoluto e preservadas em tampão de EDTA-DMSO (Seutin *et al.*, 1991). A identificação dos peixes foi realizada através de especialistas do grupo, e de acordo com o Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil – IV. Teleostei (3), de Menezes & Figueiredo (1980).

Procedimento molecular

Extrações foram realizadas utilizando-se o kit EZ-DNA, conforme orientação do fabricante (Biosystems, Brasil). De 1 a 7 indivíduos de cada espécie foram utilizados para a obtenção de seqüências dos genes mitocondriais 16S rRNA e citocromo b. Para a amplificação dos fragmentos desejados, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) (Mullis & Faloona, 1987) foi realizada em termocicladores Eppendorf (Personal Thermocycler). Para o gene 16S rRNA, cada 25 µl da reação continha concentrações finais de 2 µM de cada primer (forward / reverse), 0,18 mM de dNTP, 6 mM de MgCl, 2,5 U de Taq polimerase, tampão (buffer) 1x, e 2,4 ng/µl de amostra do DNA do peixe. Para o gene citocromo b, cada 25 µl da reação continha 2 µM de cada primer (forward / reverse), 0,2 mM de dNTP, 3 mM de MgCl, 2,5 U de Taq polimerase, tampão (buffer) 1x, e 2,4 ng/µl de amostra do DNA do peixe. Os primers utilizados para amplificação do fragmento do gene 16S rRNA foram 16S ar e 16S Br (Palumbi *et al.*, 1991); e para o gene citocromo b, L14725L e HMVZ16 (Santos *et al.*, 2003), os quais amplificam seqüências com aproximadamente 500 e 800 pares de bases, respectivamente (Tabela II).

Tabela I. Espécimes coletados, seus respectivos códigos de tombamento, data e local de coleta. Asterisco indica indivíduos cuja seqüência foi utilizada na reconstrução da filogenia de Pachyurinae.

Nome da espécie	Código	Data	Local de coleta - Bacia hidrográfica
<i>Pachypops fourcroi</i>	PARA 371*	-- /07/05	Rio Almas - Bacia do Tocantins
<i>Petilipinnis grunniens</i>	PARA 165	-- / -- / --	Bacia Amazônica-Tocantins
	PARA 353	-- /07/05	Rio Tocantins – Jusante - Bacia do Tocantins
	PARA 354*	-- /07/05	Rio Almas - Bacia do Tocantins
	PARA 355	-- /07/05	Rio Almas - Bacia do Tocantins
	PARA 361	-- /07/05	Rio Tocantins – Jusante - Bacia do Tocantins
	<i>Pachyurus adspersus</i>	PARA 315	16/10/03
PARA 316*		16/10/03	Poço da Barra, Rio Paraíba do Sul – RJ Bacia do Rio Paraíba do Sul
PARA 317		16/10/03	Poço da Barra, Rio Paraíba do Sul – RJ Bacia do Rio Paraíba do Sul
PARA 318		16/10/03	Poço da Barra, Rio Paraíba do Sul – RJ Bacia do Rio Paraíba do Sul
PARA 320		16/10/03	Poço da Barra, Rio Paraíba do Sul – RJ Bacia do Rio Paraíba do Sul
PARA 321		16/10/03	Poço da Barra, Rio Paraíba do Sul – RJ Bacia do Rio Paraíba do Sul
<i>Pachyurus bonariensis</i>	PARA 182	05/03/03	Rio Uruguai - Bacia dos Rios Paraná-Paraguai-Uruguai
	PARA 183*	05/03/03	Rio Uruguai - Bacia dos Rios Paraná-Paraguai-Uruguai
	PARA 185	05/03/03	Rio Uruguai - Bacia dos Rios Paraná-Paraguai-Uruguai
<i>Pachyurus francisci</i>	PARA 322	09/05/02	UHE Três Marias - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 326	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 331	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 332	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 344*	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 345	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
<i>Pachyurus junki</i>	PARA 131	01/12/02	Rio Crixas, Brejinho de Nazaré - Bacia do Tocantins
	PARA 142	01/12/02	Rio Crixas, Brejinho de Nazaré - Bacia do Tocantins
	PARA 150	18/11/02	Rio São Valério, Santa Rosa - Bacia do Tocantins
	PARA 163*	21/11/02	Rio Tocantins, Ipueiras - Bacia do Tocantins
<i>Pachyurus squamipennis</i>	PARA 338	09/05/02	UHE Três Marias - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 339	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 340	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 341	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 342*	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 343	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
	PARA 348	09/05/02	Rio São Francisco - Bacia do Rio São Francisco
<i>Isopisthus parvipinnis</i>	PARA 385*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho
<i>Paralanchurus brasiliensis</i>	PARA 386*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho
<i>Micropogonias furnieri</i>	PARA 388*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho
<i>Larimus breviceps</i>	PARA 389*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho
<i>Menticirrhus americanus</i>	PARA 390*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho
<i>Stellifer rastriifer</i>	PARA 393*	02/04/06	Barra Velha / SC - Marinho

Tabela II. Nomes e respectivas seqüências de nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação dos genes 16S rRNA e citocromo b.

Nome do Primer	Sentido	Seqüência de nucleotídeos
16S ar	senso	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'
16S Br	antisenso	5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'
L14725L	senso	5' CGAAACTAATGACTTGAAAAACCACCGTTG 3'
HMVZ16	antisenso	5' AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT 3'

Para ambos os genes, a PCR foi realizada com 30 ou 35 ciclos (16S rRNA e citocromo b, respectivamente). Cada ciclo de PCR teve as seguintes temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão: 92°C por 30 segundos, 57°C por 40 segundos (para o 16S rRNA) e por 1 minuto (para o citocromo b), e 72°C por 30 segundos. No início do primeiro ciclo a temperatura foi mantida a 95°C por 4 minutos (desnaturação inicial) e no término do último ciclo, a 72°C por 5 minutos (extensão final).

A visualização do produto do PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta (no equipamento Vilber Lourmat®). O produto de PCR foi purificado através do kit Minelute (Qiagen) e o produto resultante foi utilizado diretamente na reação de seqüenciamento. Estas reações foram realizadas com o kit Big Dye v3 (Applied Biosystems®) e as amostras foram seqüenciadas em um seqüenciador ABI3130. As seqüências geradas foram conferidas no Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), através do alinhamento dos nucleotídeos com seqüências já conhecidas. Posteriormente, estas seqüências serão depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>).

Análises Filogenéticas

O teste da monofilia de Pachyurinae e de seus componentes foi realizado através de análises filogenéticas baseadas nos genes mitocondriais das espécies disponíveis desta sub-família e de outros cianídeos representando táxons marinhos (Tabela I). A seqüência de apenas um indivíduo de cada espécie foi utilizada nas análises. O grupo externo utilizado no enraizamento das árvores foi representado por *Epinephelus coioides* Hamilton, 1822 e *Centropomus undecimalis* Bloch, 1792 (números de acesso no GenBank: DQ154105 e AF247436, para o gene 16S rRNA; e DQ354156 e AF240739 para o gene citocromo b). As seqüências foram alinhadas com a ajuda do programa Bioedit versão 7.0.5.2 (Hall, 1999) e Clustal W versão 1.4 (Thompson *et al.*, 1994), além de ajustadas manualmente.

Hipóteses filogenéticas moleculares foram produzidas com o uso do programa PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 4.0b10 (Swofford 2003), utilizando-se os critérios da parcimônia e máxima verossimilhança (MV). O programa MrBayes versão 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) foi utilizado para as análises de inferência Bayesiana (BI). As análises foram realizadas tanto independentemente para cada gene, quanto em conjunto.

Nas reconstruções que empregaram o método da parcimônia, os caracteres receberam pesos iguais e foram considerados não-ordenados. As análises foram realizadas através de busca heurística com 1000 repetições, nas quais as árvores iniciais foram obtidas através de

adição passo-a-passo (stepwise addition), com adição de seqüências aleatória e TBR (tree bisection – reconnection) como o algoritmo de troca de ramos (Branch-swapping). Estatísticas de suporte de ramos foram apresentadas através de reamostragem (bootstrap) com 5000 repetições para as análises que utilizaram o critério da parcimônia e através de probabilidade posterior dos ramos para as análises de inferência Bayesiana.

Para a escolha do modelo de substituição de nucleotídeos, utilizou-se o programa ModelTest versão 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Conseqüentemente, para as análises de máxima-verossimilhança e inferência Bayesiana, foi utilizado o modelo GTR (Lanave *et al.*, 1984; Tavaré, 1986 e Rodríguez *et al.*, 1990) + I + Γ (Gu *et al.*, 1995 e Waddell & Penny, 1996). Para a análise de máxima verossimilhança os valores das frequências dos nucleotídeos foram: A = 0,31360, C = 0,23620, G = 0,21700 e T = 0,23320 (para o gene 16S rRNA); A = 0,24640, C = 0,41400, G = 0,13570 e T = 0,20390 (para o gene citocromo b); e A = 0,27460, C = 0,33790, G = 0,16590 e T = 0,22160 (para os genes 16S rRNA e citocromo b em conjunto). A proporção assumida para sítios invariantes foi de 0,3445 (16S rRNA), 0,4781 (citocromo b) e 0,4593 (16S rRNA mais citocromo b); e o parâmetro para a distribuição gamã foi de 0,4253 (16S rRNA), 0,616 (citocromo b) e 0,618 (16S rRNA mais citocromo b). Para a análise de inferência Bayesiana foram realizadas 2.000.000 de gerações utilizando 4 cadeias de Markov e a probabilidade posterior dos ramos foi obtida depois das 1000 primeiras gerações (burn-in).

RESULTADOS

Análises com o gene 16S rRNA

Foram obtidas 71 seqüências do gene 16S rRNA, com até 588 pares de bases. As extremidades das seqüências, as quais alinhavam com os primers, foram removidas da matriz de dados, assim como as regiões de alinhamento ambíguo. Desta forma 511 caracteres foram utilizados na análise.

A análise de parcimônia resultou em 339 caracteres constantes, 86 caracteres variáveis, mas não informativos para parcimônia e 86 caracteres informativos. Esta análise produziu 6 árvores igualmente parcimoniosas (comprimento = 342 passos, IC = 0,6550, IR = 0,4936), cujo consenso é apresentado na Figura 3. A análise de Parcimônia de Pachyurinae sugere que o grupo seja não-monofilético. Entretanto, apesar da falta de suporte para alguns ramos, como

claramente indicado na árvore de consenso como uma grande politomia, alguns clados são bem suportados. As espécies *Pp. fourcroi*, *P. junki* e *P. bonariensis* formam um clado em todas as árvores igualmente parcimoniosas (AIP), o qual é bem suportado por um valor de bootstrap de 98%. *Petilipinnis grunniens* aparece sempre como grupo irmão deste clado, também suportado por um elevado valor de bootstrap (96%). Outro clado bastante sustentado nesta análise é o formado por *P. francisci* e *P. squamipennis* (bootstrap = 93%), ambas espécies endêmicas do rio São Francisco. As espécies marinhas aparecem ora unidas em um mesmo clado, ora em dois clados distintos, separados pelas espécies de água-doce do rio São Francisco. Porém, seus ramos aparecem colapsados na árvore de consenso, pois, nenhum destes clados apresenta valor de suporte superior a 50%. As espécies de *Pachyurus* parecem não compartilhar um ancestral comum. Sendo assim, *Pachyurus* não forma um agrupamento monofilético.

As análises de máxima-verossimilhança e inferência Bayesiana resultaram em apenas uma árvore com topologias idênticas (Figuras 4-5). *Menticirrhus americanus* é o taxon basal dos Sciaenidae. As demais espécies marinhas formam um clado que é irmão daquele composto por todas as espécies de Pachyurinae. A sub-família nessas duas análises, portanto, é monofilética e suportada por um valor de probabilidade posterior (pb) de 64%.

Nessas duas análises, Pachyurinae é internamente dividido em outros dois clados irmãos basais. Um deles agrupa *Pe. grunniens*, *Pp. fourcroi*, *P. junki* e *P. bonariensis*. As três primeiras espécies ocorrem nas bacias do norte da América do Sul, enquanto a última ocorre na bacia dos Sistemas Paraná-Paraguai-Uruguaí. Este clado se mostra bem suportado (pb = 89%). O outro clado agrupa as duas espécies endêmicas do rio São Francisco (*P. francisci* e *P. squamipennis*) com *P. adpersus*, espécie que ocorre nas Bacias dos rios Paraíba do Sul, Doce e Mucuri (pb = 63%). Ao contrário da parcimônia, ambas as análises sugerem a hipótese de monofilia de Pachyurinae. No entanto, as únicas espécies dos gêneros *Petilipinnis* e *Pachypops* presentes na análise aparecem dentro do clado de *Pachyurus*, sugerindo a não-monofilia do gênero.

Análises com o gene citocromo b

Foram obtidas 83 seqüências do fragmento do gene citocromo b (CYTB), com até 823 pares de base. As extremidades das seqüências que se alinhavam com os primers foram removidas da matriz de dados. Desta forma, 742 posições homólogas alinhadas foram analisadas.

A análise de parcimônia resultou em 432 caracteres constantes, 74 caracteres variáveis, mas não informativos para parcimônia, e 236 caracteres informativos. Esta análise produziu 2 árvores igualmente parcimoniosas (comprimento = 934 passos, IC = 0,498, IR = 0,358), cujo consenso é apresentado na Figura 6. Pachyurinae e *Pachyurus*, conforme esta análise, não são monofiléticos. As espécies endêmicas do rio São Francisco (*P. francisci* e *P. squamipennis*) aparecem como grupo irmão em um clado suportado por um valor de bootstrap de 100%. *Pachyurus adpersus* aparece como grupo irmão deste clado, sustentado por um elevado suporte estatístico (Bootstrap = 93%). As outras espécies de Pachyurinae aparecem agrupadas em um mesmo clado, grupo irmão de *M. americanus*, uma espécie marinha. Porém, este relacionamento é suportado por valores de bootstrap inferiores a 50%.

As análises de máxima-verossimilhança e inferência Bayesiana resultaram em apenas uma árvore cada, com a mesma topologia (Figuras 7-8). Assim como ocorreu na análise de parcimônia, *P. adpersus*, *P. francisci* e *P. squamipennis* aparecem unidos em um mesmo clado, o qual apresenta probabilidade posterior igual a 93%. As outras espécies de Pachyurinae (*Pe. grunniens*, *Pp. fourcroi*, *P. junki* e *P. bonariensis*) aparecem unidas em um clado distinto, cuja probabilidade posterior é igual a 89%. Este clado apresenta *M. americanus* como grupo irmão, e é suportado por um valor de 90% de probabilidade posterior. Posicionando-se entre os dois cladogramas representados pelas espécies de Pachyurinae, existe um clado formado pelas demais espécies de cianídeos marinhos. As espécies de Pachyurinae das bacias dos rios São Francisco, Paraíba do Sul e Doce, são separadas das demais por um ramo que apresenta probabilidade posterior igual à 100%. Desta forma, as análises de MV e BI indicam que Pachyurinae e *Pachyurus* sejam grupos não-monofiléticos.

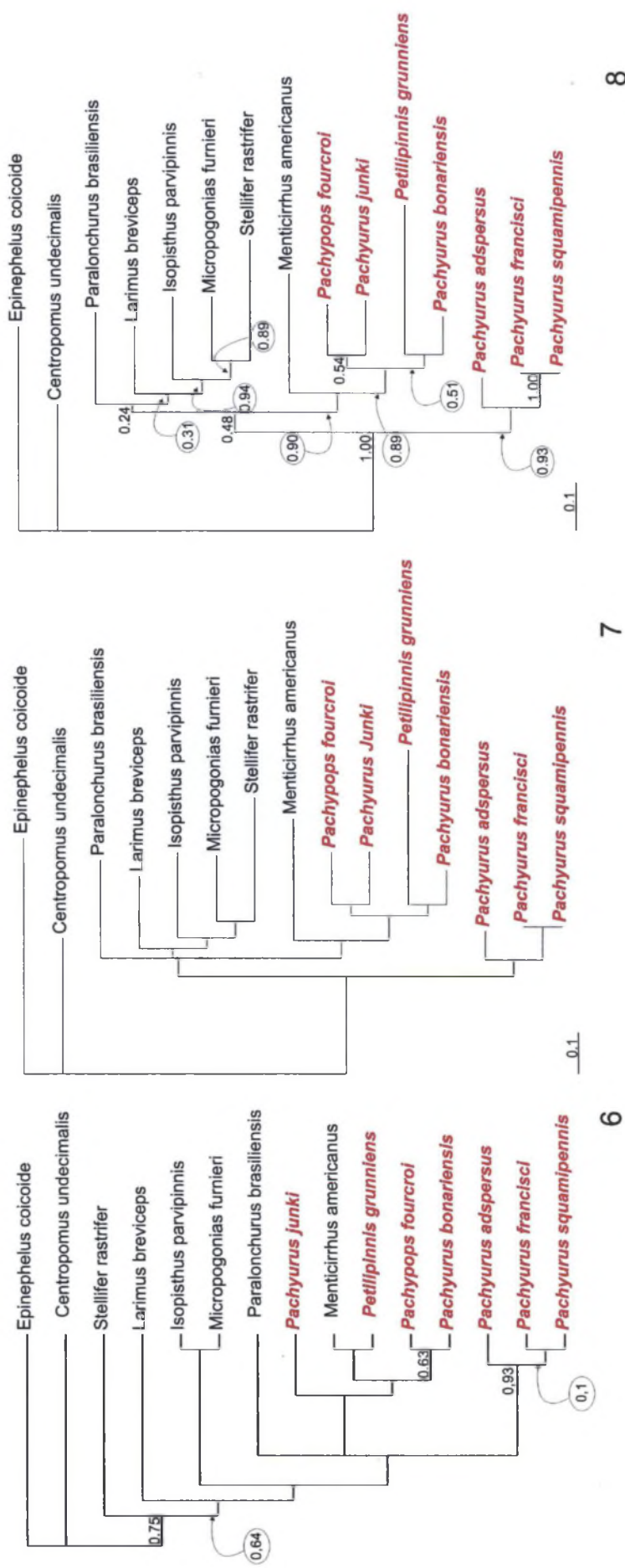
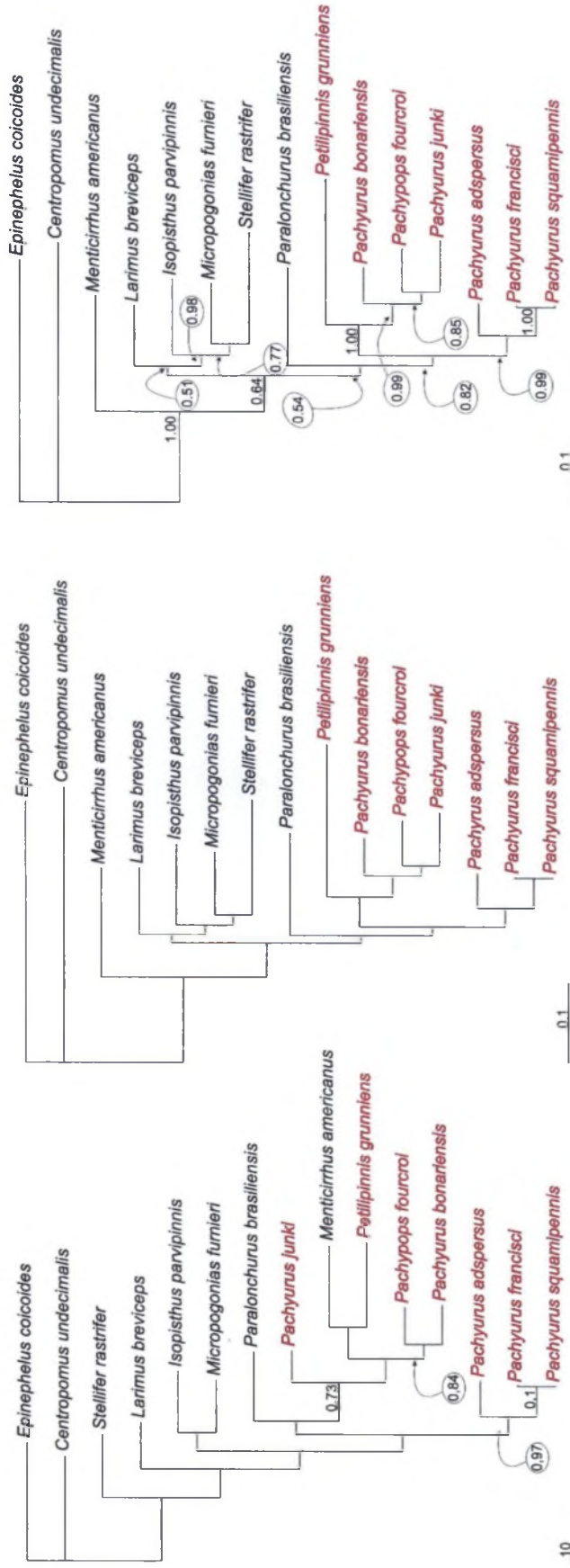


Figura 6-8. Relacionamento de grupo irmão de Pachyurinae (em vermelho) e outros Sciaenidae baseado na análise do fragmento de citocromo b. Fig. 6. Árvore de consenso estrito de dois cladogramas igualmente parcimoniosos (IC=0,498; IR=0,358); números sobre ramos representam respectivos suportes de bootstrap. Fig. 7. Cladograma de verossimilhança (-log L=4655.73829). Fig. 8. Cladograma resultante da análise de inferência Bayesiana; números sobre ramos representam respectivos valores de probabilidade posterior.

Análises conjuntas dos fragmentos dos genes 16S rRNA e citocromo b

Uma matriz de dados foi gerada agrupando-se as seqüências alinhadas dos dois genes, com o devido cuidado de utilizar sempre as seqüências do mesmo indivíduo. A partir da junção dos fragmentos dos dois genes (16S rRNA e citocromo b), obteve-se uma matriz com 1253 pares de bases. A análise de parcimônia resultou em 771 caracteres constantes, 160 caracteres variáveis mas não informativos para parcimônia e 322 caracteres informativos. Esta análise produziu apenas uma árvore (comprimento = 1297 passos, IC = 0,5312, IR = 0,3693), a qual é apresentada na Figura 9. A árvore nos mostra Pachyurinae e *Pachyurus* como grupos polifiléticos. *Pachypops fourcroi*, *P. bonariensis* e *Pe. grunniens* formam um clado com as espécies marinhas *M. americanus* (grupo irmão de *Pe. grunniens*) e *Paralonchurus brasiliensis* (espécie basal e irmã de todo o clado). Mais uma vez, as espécies representantes do rio São Francisco (*P. francisci* e *P. squamipennis*) aparecem agrupadas (Bootstrap = 100%), tendo *P. adspersus* como grupo irmão.

As análises de máxima-verossimilhança e inferência Bayesiana resultaram em uma árvore com a mesma topologia (Figuras 10-11). As espécies representantes de Pachyurinae aparecem reunidas em um mesmo clado, o qual apresenta probabilidade posterior igual a 82%. O clado da sub-família se sub-divide em dois cladogramas internos. O primeiro agrupa *P. adspersus*, *P. francisci* e *P. squamipennis*, com probabilidade posterior de 99%. O segundo agrupa o restante das espécies de Pachyurinae (*Pp. fourcroi*, *P. junki*, *P. bonariensis* e *Pe. grunniens*), com 100% de probabilidade posterior. Pachyurinae, conforme esta análise, é monofilético, mas *Pachyurus* é, como nas demais análises, não-monofilético.



11

10

9

Figura 9-11. Relacionamento de grupo irmão baseado na análise combinada dos fragmentos de citocromo b e 16S. Espécies de Pachyurinae estão representadas em vermelho. Fig. 9. Cladograma de parcimônia (IC=0,5312 IR=0,3693); números sobre ramos representam respectivos valores de bootstrap. Fig. 10. Cladograma de verossimilhança (-log L=6961,26467). Fig. 11. Cladograma resultante da análise de inferência Bayesiana; números sobre ramos representam respectivos valores de probabilidade posterior.

Para uma melhor visualização dos resultados, a Tabela 3 resume o status de Pachyurinae em cada uma das análises de acordo com o critério utilizado.

Tabela 3. Resultados obtidos nas análises filogenéticas em relação ao status de Pachyurinae, de acordo com o critério utilizado. Números entre parenteses se referem aos valores de suporte estatísticos das análises (bootstrap para parcimônia e probabilidade posterior para Inferência Bayesiana)

Critério utilizado	16S rRNA	CYTB	Genes em conjunto
Parcimônia	Polifilético (<50%)	Polifilético (<50%)	Polifilético (<50%)
Máxima-Verossimilhança	Monofilético	Polifilético	Monofilético
Inferência Bayesiana	Monofilético (64%)	Polifilético (90%)	Monofilético (82%)

DISCUSSÃO

As diversas análises filogenéticas realizadas no presente estudo apresentaram diferenças significativas. Estas diferenças podem ser notadas não apenas quando comparamos os resultados obtidos separadamente para os genes 16S rRNA e CYTB, mas também, quando consideramos os diferentes métodos de análise realizados para o mesmo gene.

Os resultados das análises de parcimônia realizadas tanto para cada gene separadamente quanto em conjunto apontam para a não-monofilia de Pachyurinae. Porém, se avaliarmos os valores de Bootstrap de cada uma dessas análises, notaremos que em nenhuma delas o valor dos clados que causam a não monofilia ultrapassa 50%. Desta forma, as análises que utilizaram o critério da parcimônia não permitiram um teste definitivo da monofilia de Pachyurinae.

As análises de máxima-verossimilhança e inferência Bayesiana sugerem duas hipóteses diferentes: a de monofilia da sub-família, com base no gene 16S rRNA e na análise conjunta dos genes; e a hipótese de não-monofilia, baseada na análise do gene CYTB. Entretanto, existe suporte estatístico (valores de probabilidade posterior) relativamente alto para os clados que resultam em ambas as hipóteses. Para o gene 16S rRNA e para a análise conjunta dos genes, os valores da referida estatística são de 64 e 82%, respectivamente. Já o valor de probabilidade posterior que suporta a hipótese de não-monofilia da sub-família, de acordo com o gene CYTB, é de 90%.

Apesar das grandes diferenças observadas entre as filogenias propostas, também existem algumas semelhanças marcantes. As espécies de Pachyurinae sempre aparecem divididas em dois grandes grupos principais, tanto nas análises que apontam para a monofilia do grupo, quanto nas que sugerem a não-monofilia. O primeiro grupo é formado por *P. francisci*, *P. squamipennis* e *P. adpersus*. Em todas as análises, *P. francisci* e *P. squamipennis* aparecem como grupo irmão. Este clado sempre apresenta elevados valores de suporte, sendo que o menor valor foi de 89% de probabilidade posterior (na análise de inferência Bayesiana, baseada no gene 16S rRNA) e o maior foi de 100% (em todas as análises realizadas para o gene CYTB e para os dois genes em conjunto).

Pachyurus francisci e *P. squamipennis* distribuem-se ao longo do sistema da Bacia do Rio São Francisco, não havendo ocorrência em outras bacias. Neste caso, existe uma forte evidência de que a colonização do Rio São Francisco se deu por uma única espécie de Pachyurinae e que esta, por especiação subsequente, deu origem às duas atuais espécies. *Pachyurus adpersus* parece compartilhar um ancestral comum com estas duas espécies,

apesar de aparecer separado deste clado em duas das seis árvores mais parcimoniosas resultantes da análise com o gene 16S rRNA. Nas demais análises (com o gene CYTB e dos fragmentos em conjunto), os valores de bootstrap e probabilidade posterior que agrupam *P. adpersus* com as duas espécies do São Francisco foram iguais ou superiores a 93%. Esta espécie se distribui em rios da região sudeste do Brasil, nas bacias dos rios Paraíba do Sul, Doce e Mucuri. Pressupondo tanto a monofilia de Pachyurinae quanto a não-monofilia, a hipótese de que a associação entre *P. adpersus* com o parasito *S. penteormos* seja histórica não é suportada. Se considerarmos a monofilia do grupo, cinco eventos de extinções locais deveriam ser assumidos para explicar a ausência deste parasito nas demais espécies da sub-família. Considerando a não-monofilia, pelo menos dois eventos de extinção locais deveriam ser assumidos, já que *P. francisci* e *P. squamipennis* não possuem registro de serem hospedeiros deste parasito. Assim, a hipótese mais suportada é a de Fehlauer (2005). A associação entre parasito e hospedeiro deve ser de fato resultante de dispersão, troca de hospedeiro, subsequente à colonização do ambiente continental pelos Pachyurinae.

Petilipinnis grunniens, *Pp. fourcroi*, *P. junki* e *P. bonariensis* aparecem sempre unidos, formando o outro grande clado de Pachyurinae. O clado que agrupa estas espécies sempre apresenta elevados valores de suporte estatístico (probabilidade posterior igual ou superior a 89%). As três primeiras espécies ocorrem na Bacia do Amazonas-Tocantins enquanto que a última se distribui na Bacia dos Rios Paraná-Paraguai-Uruguai. Esta relação parece refletir o evento de captura de cabeceiras do Sistema Orinoco-Amazonas pelo Rio Paraná (Lundberg *et al.*, 1998), o qual deve ter resultado na captura de representantes da ictiofauna Amazônica pelos rios do Sistema Paraná-Paraguai-Uruguai. Porém, nas análises em que o critério da parcimônia foi utilizado, o clado aparece entremeado por espécies de cianídeos marinhos. No entanto, nenhum dos cladogramas resultantes apresentou valor de suporte (bootstrap) maior que 50%.

Os resultados conflitantes entre protocolos e fragmentos analisados podem estar pelo menos parcialmente relacionados com a escolha dos grupos externos das análises. *Epinephelus coioides* e *Centropomus undecimalis* pertencem às famílias Serranidae e Centropomidae, respectivamente. Estas também são famílias de Perciformes, assim como Sciaenidae, porém, não tão próximas filogeneticamente (Vinson *et al.*, 2004). Esta escolha foi realizada por se tratar de peixes Perciformes, não pertencentes à família Sciaenidae e que possuíam seqüências dos dois genes analisados neste trabalho depositadas no GenBank. Muito provavelmente esta escolha deverá ser revista em análises futuras. Além disso, novas análises utilizando-se genes

diferentes, especialmente nucleares, se fazem necessárias para obtermos uma resolução mais robusta para os problemas encontrados neste trabalho.

As validades dos gêneros *Pachyurus*, *Petilipinnis* e *Pachypops* parecem ser questionáveis. A única espécie de *Petilipinnis* e a espécie disponível de *Pachypops* estão sempre inseridas dentro de clados que incluem espécies de *Pachyurus*. Curiosamente, dados da literatura nos mostram que *Pachypops fourcroi* já foi considerado anteriormente como pertencente ao gênero *Pachyurus*, sob o nome *Pachyurus natteri* Steindachner, 1863, enquanto que *Pachyurus adpersus* era também conhecido como *Pachypops adpersus* Steindachner, 1879 (Casatti, 2002 e Froese & Pauly, 2006). O gênero *Petilipinnis* foi recentemente proposto por Casatti (2001), em substituição de *Corvina*, nome que já estava sendo ocupado em Aves, além de ser sinonímia de *Sciaena* Linnaeus, 1758. Segundo a autora, esta espécie não pertence aos gêneros já descritos (*Pachyurus* e *Pachypops*) devido à presença de apenas um espinho na nadadeira caudal, diferentemente dos outros dois que possuem dois espinhos. A partir das filogenias encontradas para o presente trabalho, uma reavaliação dos gêneros de Pachyurinae se faz necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, O. & de Aguilera, D. R., 2001. A new species of croaker *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the Orinoco River Basin, Venezuela. *Memoria*, 60(153):61-67.
- BOEGER, W. A. P., & Kritsky, D. C., 2003. Parasites, Fossils and geologic history: historical biogeography of the South American freshwater croakers, *Plagioscion* species (Teleostei, Sciaenidae). Noruega. In *Zoologica Scripta*, 32:3-11.
- BROOKS, D. R. & McLennan, D. A., 1991. Phylogeny, ecology, and behavior: A research program in comparative biology. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 434 pp.
- CASATTI, L., 2000. Taxonomia e relações filogenéticas das corvinas de água doce sul americanas (Sciaenidae; Perciformes). Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista. 189 pp.
- CASATTI, L., 2001. *Petilipinnis*, a new genus for *Corvina grunniens* Schomburgk, 1843 (Perciformes, Sciaenidae) from the Amazon and Essequibo river basins and redescription of *Petilipinnis grunniens*. *Papéis Avulsos de Zoologia*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 42 (7):169-181.
- CASATTI, L., 2002. Taxonomy of the South American genus *Pachypops* Gill 1861 (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae), with the description of a new species. *Zootaxa*, 26:1-20.
- CASATTI, L., 2003. Sciaenidae (Drums or croakers). p. 599-602. In: R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- CASATTI, L. & Chao, N. L., 2002. A new species of *Pachyurus* Agassiz 1831 (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae) from the Río Napo basin, Eastern Ecuador. *Zootaxa*, 38:1-7.
- CRAIG, M. T., Pondella, D. J., Franck, J. P. C. & Hafner, J. C., 2001. On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1):121-130.
- DOMINGUES, M. V. & Boeger, W. A., 2006. Revision and Phylogeny of Rhamnocercinae Monaco, Wood et Mizelle, 1954 (Monogenoidea, Diplectanidae). *Folia Parasitologica*, v. 53, n. 3, p. 107-116.
- ESCHMEYER, W. N., Editor, 2003. Catalog of fishes. Updated database version of March 2003. Catalog databases as made available to FishBase in March 2003.
- FEHLAUER, K. C., 2005. Análise histórica da fauna de monogenoidea (Platyhelminthes) de Pachyurinae (Teleostei, Perciformes) em cinco regiões hidrográficas da América do Sul. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. 94 pp.

- FERREIRA, E. J. G., Zuanon, J. & dos Santos G. M., 1996. A list of commercial fish species from Santarém, State of Pará, Brazil. *Naga ICLARM Q.* 19(3):41-44.
- FROESE, R. & Pauly, D. Editors. 2005. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (05/2006).
- GÓMEZ, S. E. & Chebez, J. C., 1996. Peces de la provincia de Misiones. Fauna Misionera. Catálogo sistemático y zoogeográfico de los vertebrados de la Provincia de Misiones (Argentina). L.O.L.A., Buenos Aires. Peces Misiones (BOOK): 39-70.
- GU, X., Fu, Y.-X. & Li, W.-H., 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol. Biol. Evol.* 12:546-557.
- HALL, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HILLIS, D. M., Moritz, C. & Mable, B. 1996. *Molecular Systematics*. 2^a edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A. 655p.
- HUELSENBECK, J. P. & Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- LANAVE, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.*, 20:86-93.
- LOVEJOY, N. R. & de Araújo, M. L. G., 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorrhaphis*. *Molecular Ecology*, 9, 259-268.
- LOVEJOY, N. R. & Collette, B. B., 2001. Phylogenetic relationships of New World Needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia – American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, (2):324-338.
- LUNDBERG, J. G., Marshall, J., Guerrero, B., Horton, M.C.S.L., Malabarba & F. Wesseningh., 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena e C. A. S. Lucena (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp 13-48). Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS.
- McALLISTER, D. E., 1990. A working list of fishes of the world. Copies available from D.E. McAllister, Canadian Museum of Nature, P.O. Box 3443, Ottawa, Ontario K1P 6P4, Canada. 2661 p. plus 1270 p. Index
- MENEZES, N. A. & Figueiredo, J. L., 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. São Paulo. pp 42-59.
- MEYER, A., 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. Elsevier Science Ltd. *Tree*, 9(8):278-280.

- MULLIS K. B. & Faloona F. A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 55:335-350.
- NEAR, T. J., Pesavento, J. J. & Cheng, C. C., 2003. Mitochondrial DNA, morphology, and the phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28:87-98.
- ORTEGA, H. & Vari, R. P., 1986. Annotated checklist of the freshwater fishes of Peru. *Smithson. Contrib. Zool.* (437):1-25.
- ORTÍ, G. & Meyer, A., 1997. The Radiation of Characiform Fishes and the Limits of Resolution of Mitochondrial Ribosomal DNA Sequences. *Syst. Biol.* 46(1): 75-100.
- PAGE, L. M. & Burr, B. M., 1991. A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. Houghton Mifflin Company, Boston. 432 p.
- PALUMBI S. R., Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G., 1991 The simple fool's guide to PCR, Version 2. University of Hawaii, Zoology Department, Honolulu, HI. 46 pp.
- POSADA, D. & Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.
- ROBINS, C. R., Bailey, R. M., Bond, C. E., Brooker, J. R., Lachner, E. A., Lea, R. N. & Scott, W. B., 1991. World fishes important to North Americans. Exclusive of species from the continental waters of the United States and Canada. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* (21):243 pp.
- RODRÍGUEZ, F., Oliver, J. L., Marín, A. & Medina, J. R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.*, 142:485-501.
- SANTOS, S., Schneider, H. & Sampaio, I. 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26(2):151-161.
- SASAKI, K., 1989. Phylogeny of the family Sciaenidae, with notes on its zoogeography (Teleostei, Perciformes). *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 36:1-137.
- SASAKI, K., 2001. Sciaenidae. Croakers (drums). p. 3117-3174. In: K.E. Carpenter and V.H. Niem (eds.) *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 5. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae)*. Rome, FAO. pp. 2791-3380.
- SEUTIN, G., White, B. N. & Boag, P. T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian J. Zool.*, 69:82-90.
- SWOFFORD, D. L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- TAVARÉ, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lec. Math. Life Sci.* 17:57-86.
- THOMPSON, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, submitted, June 1994.
- TSIGENOPOULOS, C. S. & Berrebi, P., 2000. Molecular Phylogeny of North Mediterranean Freshwater Barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) Inferred from Cytochrome b Sequences: Biogeographic and Systematic Implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(2):165-179.
- VINSON, C., Gomes, G., Schneider, H. & Sampaio, I., 2004. Sciaenidae fish of the Caeté River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage. *Genet. Mol. Biol.*, 27(2):174-180.
- WADDELL, P. J. & Penny, D., 1996. Evolutionary trees of apes and humans from DNA sequences. In A. J. Lock and C. R. Peters (eds.), *Handbook of Symbolic Evolution*. Clarendon Press, Oxford (in press).