

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

NATHALIA ALVES DIAMANTE

Diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) de cinco bacias hidrográficas neotropicais

Maringá
2015

NATHALIA ALVES DIAMANTE

Diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus*
(Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) de cinco bacias hidrográficas
neotropicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dra. Sônia Maria Alves Pinto Prioli
Co-Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

D537d Diamante, Nathalia Alves
Diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) de cinco bacias hidrográficas neotropicais / Nathalia Alves Diamante. -- Maringá, 2015.
59 f. : il. color., figs., tabs. + anexos

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Sônia Maria Alves Pinto Prioli.
Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.

1. *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) "curvina" (Perciformes, Sciaenidae) - Variabilidade genética. 2. Peixes de água doce - Alto rio Paraná - Paraná. 3. Peixes de água doce - Bacia do Rio Tocantins - Tocantins. 4. Peixes de água doce - Bacia Amazônica - Amazônia. 5. Peixes de água doce - Bacia do Rio Parnaíba - Piauí. 6. Peixes de água doce - Bacia do Rio São Francisco - Bahia e Pernambuco. 7. Marcadores moleculares - ATPase. 8. Biogeografia - Água doce. I. Prioli, Sônia Maria Alves Pinto, orient. II. Prioli, Alberto José, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. IV. Título.

CDD 21.ed. 597.725

MN-001997

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA ALVES DIAMANTE

Diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) de cinco bacias hidrográficas neotropicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Pinto Prioli
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo

Profa. Dra. Alessandra Valéria de Oliveira
Instituto Federal do Paraná – Campus Paranavaí

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2015.

Local de defesa: Bloco G80, Sala 202, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização. E em especial ao meu avô Guerino Diamante (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

A Deus;

Em especial à Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Alves Pinto Prioli pela orientação, amizade e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Alberto José Prioli pelos ensinamentos e auxílio em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Genética, Isadora, Thaís, Nédia, Vivian, Luciano, Thaty, Rodrigo, Thomaz e João Paulo pela amizade e por auxiliarem sempre que preciso;

Aos técnicos de laboratório, Maria José e Donizete, pelo suporte técnico;

Ao Nupélia e ao programa PELD pelo suporte nas coletas;

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Comparada por permitir que eu realizasse este mestrado;

A todos os professores, funcionários e colegas de mestrado do Programa de pós-graduação em Biologia Comparada;

A Capes pela bolsa de estudo;

À minha família, em especial, aos meus pais, Adelmo e Guilhermina, por sempre estarem ao meu lado e me incentivarem;

Ao professor Ricardo de Melo Germano por todo incentivo;

Ao Cleiton pelo apoio e incentivo;

E as amigas Larissa, Anamaria, Natália e Aline pela amizade, companhia e por tornar esses dois anos de mestrado mais divertidos.

EPÍGRAFE

“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza, e que não há mundos novos a conquistar”.

(HUMPHRY DAVY)

Diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) de cinco bacias hidrográficas neotropicais

RESUMO

A família Sciaenidae possui o maior número de espécies dentro da ordem Perciformes e representa um importante recurso pesqueiro mundial, com aproximadamente 70 gêneros e 270 espécies estabelecidas nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. As relações filogenéticas e a taxonomia de alguns gêneros e espécies desta família ainda são controversas. Por isso, estudos morfológicos e moleculares têm sido realizados para identificar e classificar corretamente espécies de scianídeos e também para estimar sua posição filogenética. Vinte espécies de scianídeos são reconhecidas na América do Sul, entre elas, cinco são do gênero *Plagioscion*. A corvina, *Plagioscion squamosissimus*, é uma espécie nativa da bacia Amazônica, Tocantins e do Parnaíba e que foi introduzida em reservatórios do Nordeste do Brasil e na bacia do rio Paraná. Sabendo disso, o primeiro capítulo deste trabalho trata-se de uma análise cienciométrica das publicações que utilizaram marcadores moleculares do DNA mitocondrial ou nuclear em estudos da família Sciaenidae. Já o segundo capítulo, compreende um estudo para avaliar a diversidade genética entre populações de *P. squamosissimus* nativas e introduzidas em bacias hidrográficas brasileiras, por meio da análise de sequências do gene mitocondrial ATPase 6/8. A elucidação das relações genéticas entre populações isoladas da bacia do rio Parnaíba, bacia do Tocantins, da bacia Amazônica e das populações introduzidas na bacia do alto rio Paraná e da bacia do rio São Francisco contribuirá para o conhecimento da biologia de *P. squamosissimus*.

Palavras-chave: ATPase, Cienciométrica, Corvina, Marcadores moleculares, Variabilidade genética.

Genetic diversity among populations of *P. squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) of five river basins neotropical

ABSTRACT

The Sciaenidae has the largest number of species within the order Perciformes and it is a major world fishery resource, with about 70 genera and 270 species established in the Atlantic, Indian and Pacific. Phylogenetic relationships and taxonomy of some genera and species of this family are still controversial. Therefore, morphological and molecular studies have been conducted to identify and correctly classify of species Sciaenidae and also to estimate their phylogenetic position. Twenty species of Scianidae are recognized in South America, among them five are the *Plagioscion* genus. The croaker, *Plagioscion squamosissimus*, is native to the Amazon basin, Tocantins and Parnaíba and it was introduced in Northeast reservoirs in Brazil and in the Paraná River basin. Knowing this, the first chapter of this work is a scientometric analysis of the publications that used mitochondrial or nuclear DNA molecular markers in studies of the family Sciaenidae. The second chapter includes a study to assess the genetic diversity among native and introduced populations of *P. squamosissimus* Brazilian basins, through the analysis of sequences of the mitochondrial gene ATPase 6/8. The elucidation of the genetic relationships between isolated populations of the Parnaíba river basin, the Tocantins river basin, the Amazon river basin and introduced populations in the upper Paraná river basin and the basin of the river São Francisco contribute to the knowledge of *P. squamosissimus* biology.

Keiwords: ATPase, Scientometrics, Croaker, molecular markers, genetic variability.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
Análise cienciométrica da utilização de marcadores moleculares em estudos da família Sciaenidae (Teleostei: Perciformes)	11
Resumo.....	11
Introdução	12
Materias e Métodos	13
Resultados e Discussão	14
Conclusão.....	22
Referências.....	22
ANEXO 1	26
CAPÍTULO 2	30
Estimativa da diversidade genética entre populações de <i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) por meio de análise de sequências dos genes mitocondriais ATPase 6/8.....	31
Resumo.....	31
Introdução	31
Materias e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	41
Referências.....	46
ANEXO 2	49

CAPÍTULO 1

Análise cienciométrica da utilização de marcadores moleculares em estudos da família Sciaenidae (Teleostei: Perciformes)

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde.

Análise cienciométrica da utilização de marcadores moleculares em estudos da família Sciaenidae (Teleostei: Perciformes)

Scientometric analysis of the use of molecular markers in Sciaenidae family studies (Teleostei: Perciformes)

RESUMO

Sciaenidae é uma das famílias da ordem Perciformes com espécies distribuídas nos oceanos Índico, Atlântico e Pacífico, e também em águas continentais. As relações filogenéticas e a taxonomia de alguns gêneros e espécies desta família ainda são controversas. Por isso estudos morfológicos e moleculares têm sido realizados para identificar e classificar corretamente espécies de scianídeos e também para estimar sua posição filogenética. Dentro dos estudos moleculares, o DNA mitocondrial vem sendo muito utilizado, assim como os marcadores do DNA nuclear. Como se torna crescente a preocupação com o monitoramento da produção científica, o presente estudo avaliou quantitativamente os trabalhos que utilizam marcadores moleculares em estudos da família Sciaenidae, por meio de um levantamento dos artigos publicados. Foram analisados 42 artigos e verificou-se que o número de publicações aumentou nos últimos anos, mas ainda são poucas as espécies estudadas. A maioria dos estudos utiliza apenas marcadores mitocondriais e tem como objetivo estimar as relações filogenéticas. Pode-se concluir que a filogenia de Sciaenidae ainda não está bem resolvida. Sugere-se novas pesquisas com espécies pouco estudadas, sobretudo análises mais abrangentes com dados moleculares associados com estudos morfológicos.

Palavras-chave: Bibliometria, DNA mitocondrial, DNA nuclear, Genes, Scianídeos.

ABSTRACT

Sciaenidae is one of the families of Perciformes order with species distributed in the Indian, Atlantic and Pacific oceans, and also in continental waters. Phylogenetic relationships and taxonomy of some genera and species of this family are still controversial. So morphological and molecular studies have been conducted to identify and correctly classify species of scianidea and also to estimate their phylogenetic position. Within the molecular studies, the mitochondrial DNA is extensively used as well as the nuclear DNA markers. As the concern with monitoring Science production is increasing, this study quantitatively assessed the

studies that used molecular markers in studies of the family Sciaenidae, through a survey of published articles. We analyzed 42 articles and it was found that the number of publications has increased in recent years, but there are few species. Most studies use only mitochondrial markers and aims to estimate the phylogenetic relationships. It can be concluded that the phylogeny of Sciaenidae is not well resolved. It is suggested further research with species studied, especially more comprehensive analysis with molecular data associated with morphological studies.

Keywords: Bibliometrics, mitochondrial DNA, nuclear DNA, Genes, Scianidae.

INTRODUÇÃO

O estudo das diversas populações animais auxiliados por técnicas moleculares é de suma importância para a genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente quanto para auxiliar nos estudos de espécies ameaçadas de extinção (FRANKHAM et al., 2002).

Sciaenidae é uma das muitas famílias da ordem Perciformes, e representa um importante recurso pesqueiro mundial, com aproximadamente 70 gêneros e 270 espécies encontradas nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (NELSON, 2006). Sciaenidae é numerosa e diversificada tanto no ambiente marinho como em áreas de estuários do Atlântico Sul ocidental, com aproximadamente 45 espécies e 19 gêneros descritos para esta região (CERVIGÓN, 1993). Destes, seis gêneros ocorrem em áreas continentais e quatro gêneros (*Pachyurus* La Cepède, *Pachypops* Gill, *Plagioscion* Gill, *Petilipinnis* Cassati) são habitantes de água doce da América do Sul (CASSATI, 2005).

Estudos morfológicos (CASATTI, 2005) e moleculares (TORRES, 2006) têm sido realizados para identificar e classificar corretamente espécies de scianídeos e também para estimar sua posição filogenética (JIANG et al., 2014; VERGARA-CHEN et al., 2009). Entre as metodologias de análise molecular, aquelas baseadas em fragmentos de DNA nuclear ou mitocondrial tornaram possíveis estudos genético-moleculares envolvendo um grande número de indivíduos.

O DNA mitocondrial vem sendo muito utilizado nos últimos trinta anos como instrumento para estudo da evolução de espécies e populações e mostrou-se uma eficiente ferramenta para os campos de ecologia molecular e filogeografia (BALLARD; WHITLOCK, 2004). E também é usado para a avaliação da variabilidade genética de populações de peixes introduzidos (PRIOLI et al., 2002; FROUFE et al., 2002; GOUIN et al., 2003; PANARARI-ANTUNES et al., 2012).

Marcadores de DNA nuclear têm origem biparental, são muito utilizados em reconstrução filogenética de diversos táxons e podem, eventualmente, ser usados para detectar eventos de hibridização entre espécies (FREELAND, 2005).

Enfim, trabalhos que utilizam marcadores moleculares para o estudo da família Sciaenidae certamente estão sendo realizados, mas torna-se crescente a preocupação com o monitoramento da produção científica e, para realizar essa avaliação, estudos métricos, quantitativos ou qualitativos, são cada vez mais necessários.

A bibliometria ou cienciometria é fundamental na análise da produção científica tanto de uma região de abrangência, quanto a de determinada área científica (MACIAS-CHAPULA, 1998). A ciência pode ser estudada através de seus aspectos quantitativos, e com isso gerar indicadores de desempenho do desenvolvimento científico e tecnológico que podem auxiliar na tomada de decisão para a elaboração de um projeto de pesquisa (MACHADO, 2007). Segundo Laurindo e Mafra (2010), a cienciometria não substitui um método analítico sobre determinado assunto, mas tem a competência de dar maior visibilidade à pesquisa e ajuda a identificar quais áreas precisam de maior atenção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente os trabalhos científicos que estudaram espécies da família Sciaenidae utilizando marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, realizou-se análise bibliométrica das publicações que utilizaram marcadores moleculares do DNA mitocondrial ou nuclear em estudos de espécies da família Sciaenidae. Por meio dos dados coletados, foram apontados os principais marcadores utilizados, as espécies mais estudadas e retratado o desenvolvimento dessa área.

Para o desenvolvimento deste levantamento bibliométrico, foi realizada uma pesquisa delimitada aos artigos encontrados no sítio do Thomson Reuters Web of Knowledge, devido à sua abrangência quanto ao número de publicações e qualidade das revistas indexadas.

A estratégia para a busca no banco de dados foi a de utilizar as palavras-chave “DNA mitochondrial” e “Sciaenidae” em conjunto, e uma segunda busca utilizando as palavras-chave “DNA nuclear” e “Sciaenidae”. Foi feita uma triagem para identificar e retirar as publicações repetidas e aquelas que não se enquadraram nos parâmetros de interesse. Para que os artigos participassem da amostra, os mesmos deveriam utilizar algum marcador molecular do DNA mitocondrial ou nuclear para resolver alguma questão taxonômica, filogenética ou algum outro problema dentro da família dos scianídeos. Os artigos de revisão também não

participaram da constituição da amostra. Além disso, foram considerados todos os artigos encontrados, independentemente do ano de publicação.

Os artigos encontrados foram lidos, tabulados e separados por ano de publicação, país onde foram realizados os estudos, espécies estudadas, marcadores moleculares utilizados e objetivos. O levantamento ocorreu entre os meses de outubro de 2014 e dezembro de 2014. Os resultados foram expressos em função de seu número relativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 55 artigos utilizando as palavras-chave “DNA mitochondrial” e “Sciaenidae”, e 11 artigos com as palavras-chave “DNA nuclear” e “Sciaenidae”. Destes, apenas 42 artigos enquadraram-se na proposta da pesquisa e serviram como amostra para análise cienciométrica.

Quanto ao ano de publicação, foram encontrados artigos publicados desde 1999 até 2014. O maior volume de publicações ocorreu nos anos de 2009, 2011, 2012 e 2014 com cinco, sete, nove e cinco artigos publicados, respectivamente (Figura 1). Fabrin et al. (2014) em análise cienciométrica dos marcadores utilizados na filogenia de ciclídeos também observaram um aumento nas publicações que utilizam marcadores moleculares nos últimos anos. Assim como no trabalho citado acima, atribuímos este aumento à diminuição dos custos para utilizar técnicas moleculares, aos equipamentos necessários que tornaram-se mais acessíveis, à capacitação dos pesquisadores e à divulgação e disponibilização de novas sequências de genes em banco de dados *online*, facilitando o trabalho dos pesquisadores. Além disso, as quedas bruscas no número de publicações entre um ano e outro provavelmente devem-se aos ciclos produtivos dos grupos de pesquisa, pois logo após essa queda há um aumento no número de artigos publicados no ano seguinte.

Os países que mais publicaram trabalhos que utilizam marcadores moleculares para o estudo da família Sciaenidae foram: China com 14 artigos publicados (33,33% do total de publicações), Brasil com nove publicações (21,42%), Estados Unidos quatro artigos publicados (9,5%) e Japão com três artigos (7,15%). França, Argentina, Coreia, México, Uruguai e Índia publicaram cada um apenas um artigo, e ainda ocorreram publicações em conjunto entre Espanha/Estados Unidos/Panamá, Brasil/Alemanha, Espanha/Panamá, Brasil/Austrália, Itália/ Estados Unidos, Inglaterra/ África do Sul/Angola, também com um artigo cada, totalizando 12 publicações (28,5%) (Figura 2). As espécies de scianídeos são encontradas nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (NELSON, 2006), o que explica o maior número de publicações por grupos de pesquisa da China, que tem sua costa banhada pelo

oceano Pacífico, e o Brasil banhado pelo oceano Atlântico. E, com isso, evidenciamos a falta de pesquisa com espécies de scianídeos naturais do oceano Índico.

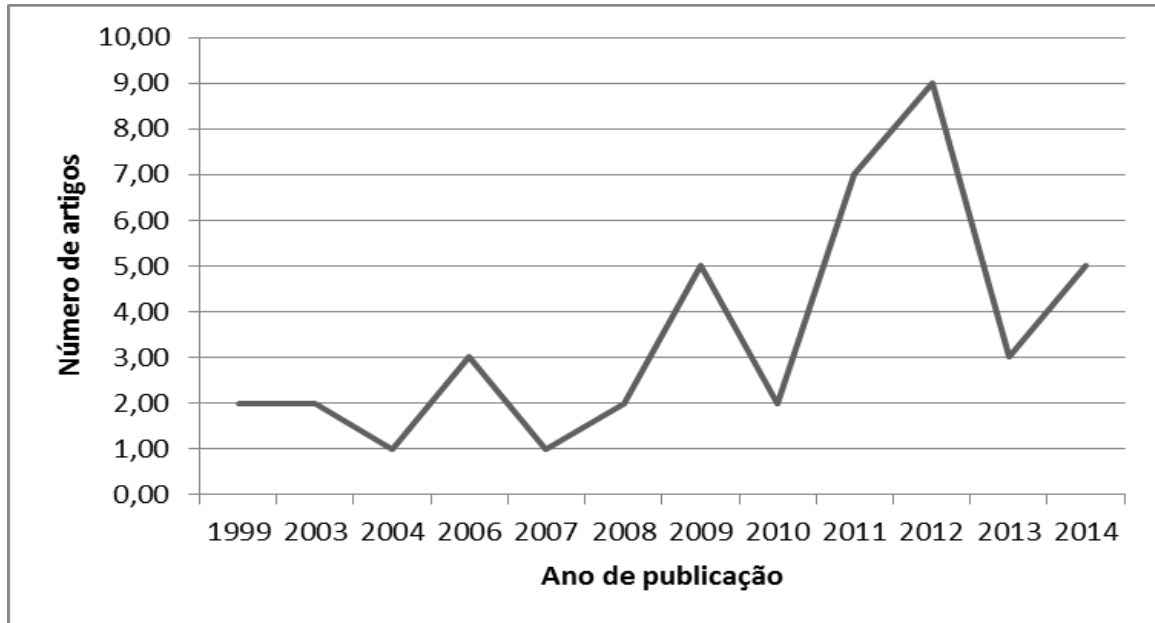


Figura 1: Quantidade de artigos científicos publicados sobre scianídeos utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial e nuclear por ano.

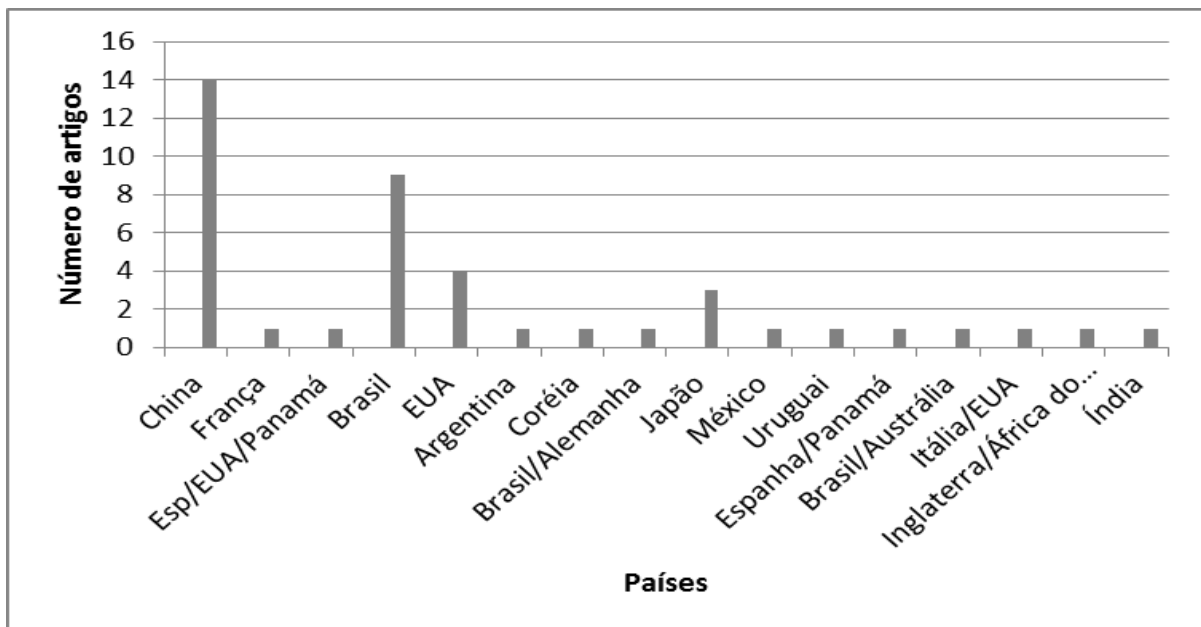


Figura 2: Número de publicações sobre scianídeos utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial e nuclear por país de filiação dos autores.

A maioria dos trabalhos foi realizada com espécies de scianídeos marinhos, o que é facilmente compreendido já que a maioria das espécies da família Sciaenidae é marinha. Dos 42 artigos selecionados, 34 (81%) estudaram exclusivamente espécies marinhas, cinco (12%) estudaram espécies marinhas e de água doce e três (7,15%) privilegiaram espécies de água doce.

Da família Sciaenidae foram estudados 24 gêneros e 102 espécies diferentes. O gênero mais estudado foi *Cynoscion*, com 20 espécies em 9 artigos. As mais estudadas foram as espécies marinhas *Larimichthys polyactis* (citada em dez dos 42 artigos), *Larimichthys crocea* (citada em oito artigos), *Collichthys lucidus* (sete), *Macrodon ancylodon* (sete), *Micropogonias furnieri* (sete), *Miichthys miiuy* (seis) e a de água doce *Plagioscion squamosissimus* (seis) (Tabela 1). *Plagioscion squamosissimus* foi a espécie de água doce mais estudada através de marcadores moleculares do DNA mitocondrial ou nuclear, o que evidencia sua importância econômica e ecológica, mas ainda assim o número de publicações com marcadores moleculares para esta espécie, seis artigos, é pouco expressivo. Apesar da diversidade de espécies poucos estudos têm avaliado a relação filogenética dos scianídeos, e os estudos disponíveis não fornecem resultados satisfatórios (SANTOS et al., 2013).

Tabela 1: Número de citações para cada espécie de Sciaenidae abordada nos trabalhos selecionados.

Família	Gênero	Espécie	Quantidade de citações
Sciaenidae	<i>Aplodinotus</i>	<i>Aplodinotus grunniens</i>	2
		<i>Argyrosomus</i>	
		<i>Argyrosomus argentatus</i>	1
		<i>Argyrosomus Japonicus</i>	1
		<i>Argyrosomus regius</i>	2
	<i>Atractoscion</i>	<i>Atractoscion aequidens</i>	2
		<i>Atractoscion nobilis</i>	1
	<i>Bahaba</i>	<i>Bahaba taipingensis</i>	1
	<i>Bairdiella</i>	<i>Bairdiella armata</i>	2
		<i>Bairdiella ronchus</i>	5
	<i>Cheilotrema</i>	<i>Cheilotrema saturnum</i>	1
	<i>Chysochir</i>	<i>Chysochir aureus</i>	2
	<i>Clupea</i>	<i>Clupea palassi</i>	1
	<i>Collichthys</i>	<i>Collichthys lucidus</i>	7
		<i>Collichthys niveatus</i>	5
	<i>Ctenosciaena</i>	<i>Ctenosciaena gracilicirrhus</i>	1
	<i>Cynoscion</i>	<i>Cynoscion acoupa</i>	4
		<i>Cynoscion albus</i>	2
		<i>Cynoscion analis</i>	1
		<i>Cynoscion arenarius</i>	4

	<i>Cynoscion guatucupa</i>	5
	<i>Cynoscion jamaicensis</i>	2
	<i>Cynoscion leiarchus</i>	3
	<i>Cynoscion microlepidotus</i>	3
	<i>Cynoscion nebulosus</i>	3
	<i>Cynoscion nothus</i>	2
	<i>Cynoscion othonopterus</i>	1
	<i>Cynoscion parvipinnis</i>	3
	<i>Cynoscion phoxoxephalus</i>	2
	<i>Cynoscion praedatorius</i>	2
	<i>Cynoscion regalis</i>	3
	<i>Cynoscion reticulatus</i>	3
	<i>Cynoscion squamipinnis</i>	2
	<i>Cynoscion steindachneri</i>	1
	<i>Cynoscion virescens</i>	3
	<i>Cynoscion xanthulus</i>	1
<i>Isopisthus</i>	<i>Isopisthus altipinnis</i>	1
	<i>Isopisthus remifer</i>	2
<i>Johnius</i>	<i>Johnius belangerii</i>	3
	<i>Johnius borneensis</i>	1
	<i>Johnius dussumieri</i>	1
	<i>Johnius elongates</i>	1
	<i>Johnius grypotus</i>	2
	<i>Johnius sp.</i>	1
<i>Larimichthys</i>	<i>Larimichthys crocea</i>	8
	<i>Larimichthys polyactis</i>	10
<i>Larimus</i>	<i>Larimus breviceps</i>	1
<i>Lonchurus</i>	<i>Lonchurus lanceolatus</i>	2
<i>Macrodon</i>	<i>Macrodon ancylodon</i>	7
	<i>Macrodon atricauda</i>	2
	<i>Macrodon mordax</i>	2
<i>Menticirrhus</i>	<i>Menticirrhus americanus</i>	3
	<i>Menticirrhus littoralis</i>	3
	<i>Menticirrhus undulatus</i>	1
<i>Micropogonias</i>	<i>Micropogonias furnieri</i>	7
	<i>Micropogonias sp</i>	1
	<i>Micropogonias undulatus</i>	1
<i>Miichthys</i>	<i>Miichthys miiuy</i>	6
<i>Nebris</i>	<i>Nebris micros</i>	5
	<i>Nebris occidentalis</i>	2
<i>Nibea</i>	<i>Nibea albiflora</i>	5
	<i>Nibea maculata</i>	1
<i>Odontoscion</i>	<i>Odontoscion dentex</i>	1
<i>Ompok</i>	<i>Ompok bimaculatus</i>	1
	<i>Ompok pabda</i>	1

	<i>Ompok pabo</i>	1
<i>Ophioscion</i>	<i>Ophioscion punctatissimus</i>	2
<i>Otolithes</i>	<i>Otolithes cuvieri</i>	1
	<i>Otolithes ruber</i>	1
	<i>Otolithoides biauritus</i>	2
<i>Pachypops</i>	<i>Pachypops foucroi</i>	1
<i>Pachyurus</i>	<i>Pachyurus junki</i>	1
	<i>Pachyurus sp.</i>	1
<i>Paralonchurus</i>	<i>Paralonchurus brasiliensis</i>	1
<i>Pareque</i>	<i>Pareques acuminatus</i>	1
<i>Pennahia</i>	<i>Pennahia nea</i>	1
	<i>Pennahia argentata</i>	4
<i>Plagioscion</i>	<i>Plagioscion auratus</i>	3
	<i>Plagioscion magdalenae</i>	2
	<i>Plagioscion montei</i>	1
	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	6
	<i>Plagioscion Ternetzi</i>	2
<i>Pogonias</i>	<i>Pogonias cromis</i>	1
<i>Protonibea</i>	<i>Protonibea diacanthus</i>	1
<i>Pseudolithus</i>	<i>Pseudolithus elongatus</i>	1
	<i>Pseudolithus senegalensis</i>	1
	<i>Pseudolithus typus</i>	1
<i>Roncador</i>	<i>Roncador stearnsii</i>	1
<i>Sciaena</i>	<i>Sciaena sp.</i>	1
<i>Sciaenops</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	5
<i>Seriphus</i>	<i>Seriphus polithus</i>	1
<i>Stellifer</i>	<i>Stellifer brasiliensis</i>	2
	<i>Stellifer illecebrosus</i>	2
	<i>Stellifer micros</i>	3
	<i>Stellifer naso</i>	3
	<i>Stellifer rastrifer</i>	3
	<i>Stellifer sp.</i>	2
	<i>Stellifer stellifer</i>	2
<i>Tatoaba</i>	<i>Tatoaba macdonaldi</i>	1
<i>Umbrina</i>	<i>Umbrina canosai</i>	1
	<i>Umbrina canariensis</i>	1
	<i>Umbrina cirrosa</i>	1
	<i>Umbrina coroides</i>	1

Em relação aos marcadores moleculares, os do DNA mitocondrial foram utilizados em 32 publicações, marcadores do DNA nuclear foram utilizados em 10 trabalhos. O DNA mitocondrial é um dos mais utilizados para estudos de genética evolutiva, populacional, filogeografia e análises filogenéticas (BROWN, 2008). É importante ressaltar que houve trabalhos que utilizaram, em conjunto, marcadores do DNA mitocondrial e nuclear (Figura 3).

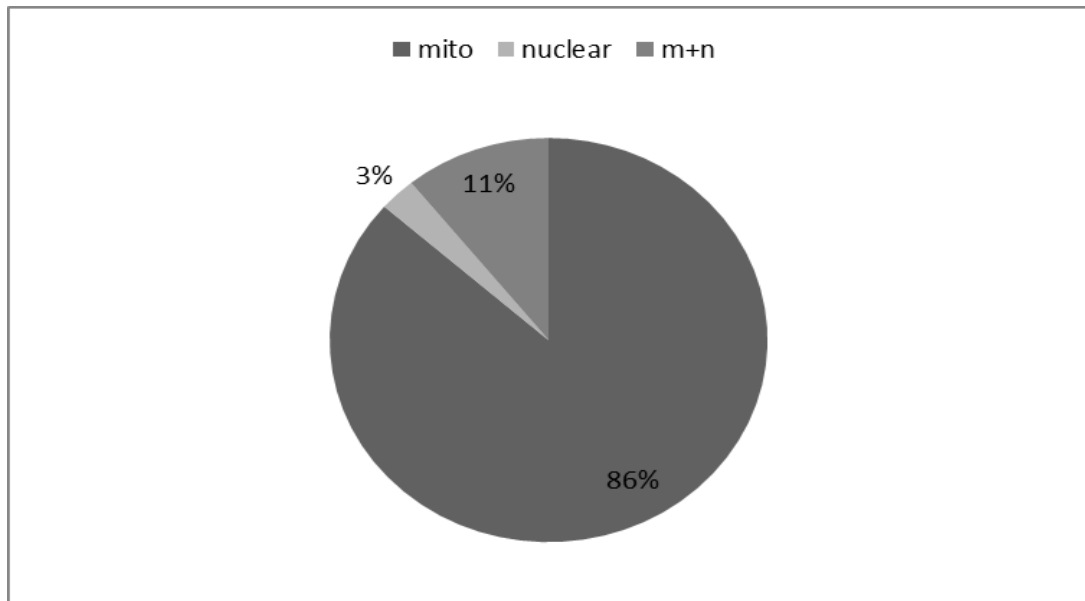


Figura 3: Porcentagem das seguintes categorias de marcadores moleculares utilizados nas publicações de Sciaenidae: DNA Mitochondrial (Mito); DNA Nuclear (Nuclear) e DNA Nuclear e Mitochondrial (m+n)

Dentre os trabalhos que utilizaram sequências do DNA mitocondrial, 23,8%, ou seja, dez dos 42 trabalhos analisados empregaram primers específicos para obtenção do genoma mitocondrial completo. A região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial foi a mais utilizada, presente em 12 dos artigos analisados, o que representa 28,6% das publicações, seguido pelos genes Citocromo b (*cyt b*) usado em 9 trabalhos ou 21,4%, RNA ribossomal 16S (*rRNA 16S*) usado em sete publicações (16,6%), Citocromo c oxidase I (*COI*) em seis trabalhos ou 14,3% e o gene *ATPase 6/8* utilizado em três (7,14%) dos trabalhos analisados.

Em sua maioria, os artigos analisados tiveram como objetivo compreender a posição filogenética de espécies dentro da família Sciaenidae ou a diversidade e estrutura genética das populações estudadas. E a região controle do DNA mitocondrial, a mais utilizada pelos artigos analisados, tem sido o principal marcador molecular para análises de variação genética, incluindo espécies de peixes (PANARARI-ANTUNES et al., 2008; HIRAYAMA et al., 2010; LO PRESTI et al., 2010).

A região controle do DNA mitocondrial, caracterizado pelo *displacement loop* (*D-loop*), é responsável pelo controle da replicação das fitas leve e pesada do DNA mitocondrial. Por ser a única região não codificadora do genoma mitocondrial, sofre menor pressão seletiva que o restante da molécula, resultando em altas taxas mutacionais. A taxa de evolução da região controle é de duas a cinco vezes maior do que a taxa dos genes mitocondriais codificadores de proteínas (MEYER, 1994; AVISE, 2004). A alta variabilidade observada

nesta região a tem tornado muito eficiente para revelar diferenciação e avaliar a variabilidade genética e filogeografia em peixes (AVISE, 2009; BROWN, 2008).

Assim como o gene Citocromo b (*Cyt b*) que codifica uma enzima da cadeia respiratória do metabolismo oxidativo das mitocôndrias (KOCHER; STEPIEN, 1997) e é extensivamente utilizado como “relógio molecular”, para estimar a diferenciação genética entre espécies (GARCÍA et al., 2000; AVISE, 2004; CHEN et al., 2014). Mas não é adequado para estimar diferenças populacionais intraespecíficas (NEI; KUMAR, 2000).

Já os genes do RNA ribossomal têm sido muito estudados em plantas e animais, principalmente em trabalhos de caracterização genética de espécies, relação evolutiva e expressão gênica (MARTINS; WASKO, 2004). O 16S rRNA gera informações úteis para inferências filogenéticas, por isso foi bastante utilizado nas publicações analisadas que tinham como objetivo obter informações sobre a filogenia de scianídeos, bem como o gene ATPase 6/8 que é bastante utilizado para a análise de filogenia e para filogeografia de espécies diversas de peixes, (CHOW; USHIAMA, 2004;. HURWOOD et al., 2008;. DAMMANNAGODA et al., 2008; VERGARA-CHEN et al., 2009).

O gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) foi escolhido para a construção de um banco de dados de códigos de barras de DNA (*DNA barcode*), que tem por finalidade a identificação de espécies e a ampliação do índice de descoberta de novas espécies (MORITZ; CICERO, 2004). O COI é eficiente em discriminar espécies e apresenta uma sequência bastante conservada que facilita a utilização de primers universais (HEBERT et al., 2003). E Por isso foi mais utilizado entre os trabalhos analisados que tinham objetivos taxonômicos.

Em relação aos marcadores do DNA nuclear, sequências dos genes RAG 1, Tmo 4C4 e Rhodopsin foram estudados em dois trabalhos cada, somando 14,28% dos artigos analisados. O marcador *exon-primed intron-crossing* (EPIC), um tipo de marcador nuclear que fornece várias vantagens em estudos filogenéticos (LI et al., 2010), e os genes RNF213, MLL e IRBP estiveram presentes em um artigo cada, totalizando 9,5%.

As relações filogenéticas entre *Stellifer*, *Odontoscion*, *Ophioscion* e *Bairdiella* (Sciaenidae, Perciformes) foram avaliadas através dos genes nucleares Tmo-4C4, RAG 1 e rhodopsin (BARBOSA et al., 2014). O marcador nuclear Tmo-4C4 vem sendo bastante usado em análises filogenéticas de gêneros e famílias de peixes (RÜBER et al., 2004; ROCHA et al., 2008) e mostrou-se eficaz para a taxonomia molecular quando utilizado em conjunto com marcadores mitocondriais (MUSILOVÁ et al., 2009; VIÑAS et al., 2010).

Já o gene nuclear RAG 1 vem sendo empregado em trabalhos de filogenia e filogeografia (BARBOSA et al., 2014; COOKE et al., 2012). E o RNF213, um novo

marcador nuclear, e os genes Rhodopsin, MLL e IRBP foram utilizados para análise filogenética entre várias espécies de scianídeos (LI et al., 2009). Na tabela 2 encontra-se uma lista dos marcadores do DNA mitocondrial e nuclear utilizados nos trabalhos analisados.

As principais técnicas que utilizam o DNA nuclear, como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisins*), o *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, e o *Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)* foram encontradas nos trabalhos analisados. O RFLP foi utilizado em 5 trabalhos, 11,90%, o RAPD foi utilizado em duas publicações, 4,76% e o SNP foi utilizado em apenas 1 trabalho.

Em sua maioria, os artigos analisados tiveram como objetivo compreender a posição filogenética de espécies dentro da família Sciaenidae ou a diversidade e estrutura genética das populações estudadas. Taxonomia, filogeografia, eventos de hibridização e mapeamento genético também foram alvo de alguns trabalhos analisados (Figura 4). Por isso, utilizaram marcadores eficientes para responder essas questões, como o *D-loop*, eficiente para revelar diferenciação e avaliar a variabilidade genética e filogeografia em peixes; a ATPase, bastante utilizada para a análise de filogenia e para filogeografia; o COI, eficiente em discriminar espécies; o Tmo- 4C4 eficaz para a taxonomia molecular quando utilizado em conjunto com marcadores mitocondriais, entre outros.

Tanto os marcadores nucleares quanto os mitocondriais mostraram-se eficientes para resolver questões taxonômicas e filogenéticas e para avaliar a variabilidade genética dentro de scianídeos. Entretanto, os marcadores mitocondriais foram os mais utilizados entre todas as publicações, apesar de utilizada uma maior variedade de marcadores nucleares (Tabela 2).

Tabela 2: Marcadores do genoma nuclear e mitocondrial utilizados nos artigos analisados sobre Scianidae.

Marcadores moleculares utilizados	
Mitocondrial	Nuclear
Genoma mitocondrial completo	Exon- primed intron- crossing (EPIC)
Citocromo C oxidase (COI)	RNF213
Citocromo B (<i>Cyt b</i>)	MLL
ATPase subunidade 6/8	IRBP
RNA ribossomal 16S	Tmo4c4
Região controle (D-loop)	RAG 1
	RFLP
	RAPD
	SNPs

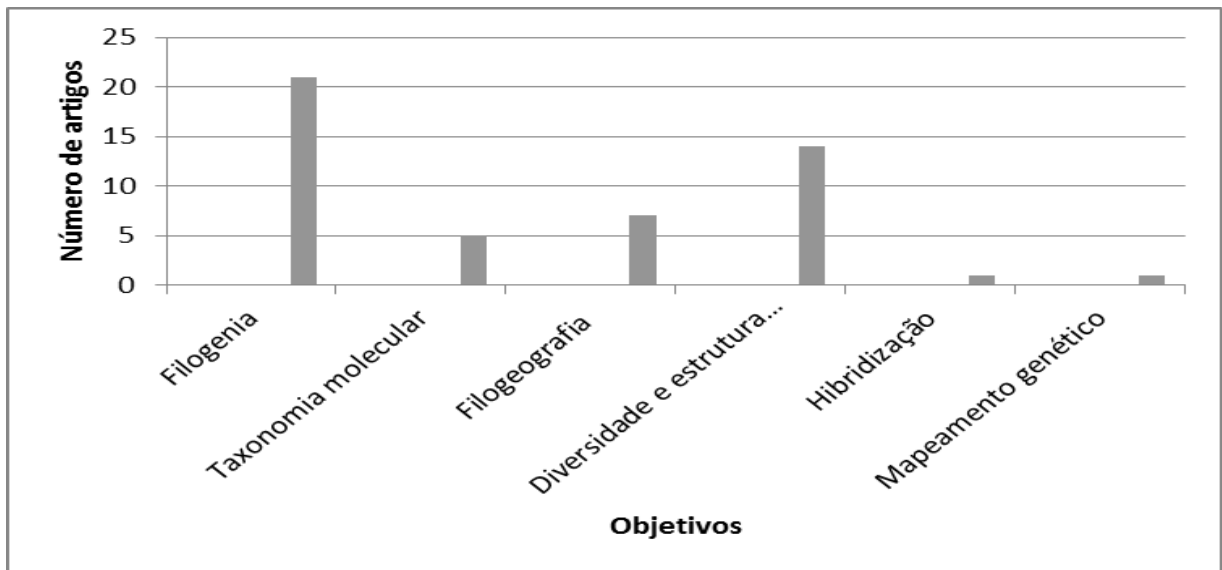


Figura 4: Número de artigos em relação aos objetivos propostos pelos trabalhos analisados com Sciaenidae.

CONCLUSÃO

O número de publicações encontradas que utilizam marcadores moleculares em estudos da família Sciaenidae foi baixo, considerando que esta família é bastante numerosa e diversificada, e que algumas relações filogenéticas entre alguns gêneros e espécies ainda não foram totalmente elucidadas. Nos últimos anos verificou-se um aumento nas publicações, mas elas ainda, em sua maioria, são frutos de trabalhos de pesquisadores de apenas quatro Países: China, Brasil, Estados Unidos e Japão, que estudam espécies de suas regiões e com isso espécies endêmicas de outras regiões deixam de ser estudadas. Menos da metade das espécies de scianídeos conhecidas foram estudadas através de sequências do DNA mitocondrial e nuclear. Dos trabalhos analisados, grande parte utilizou apenas sequências do DNA mitocondrial em suas análises. Sabe-se que a análise que em conjunto de sequências do DNA mitocondrial e nuclear trazem resultados mais satisfatórios.

Portanto, sugerimos que novas pesquisas sejam feitas para melhorar o conhecimento da filogenia, filogeografia, taxonomia e também para avaliar a diversidade genética dentro da família Scienidae, sobretudo análises mais abrangentes, e entre os grupos pouco estudados.

REFERÊNCIAS

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p.315, 2009.

- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Sinauer Associates, 684p, 2004.
- BALLARD, W. O.; WHITLOCK, M. C.; The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v.13, p.729-744, 2004.
- BARBOSA A. J. B et al. Molecular Phylogeny of Weakfish Species of the *Stellifer* Group (Sciaenidae, Perciformes) of the Western South Atlantic Based on Mitochondrial and Nuclear Data. **PLoS ONE**, v.9, n.7, 2014.
- BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance, and functional variation. **Journal of fish biology**, v.72, p.355-374, 2008.
- CASATTI, L. Revision of the South American freshwater genus *Plagioscion* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Revista Zootaxa**. v.1080, p.39-64, 2005.
- CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. Caracas: Fundación Científica Los Roques, 1993.
- CHEN, S. et al. Differentiation of fish species in Taiwan Strait by PCR-RFLP and lab-on-a-chip system. **Food Control**, v.44, p.26-34, 2014.
- CHOW, S.; USHIAMA, H. Global population structure of albacore *Thunnus alalunga* inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. **Marine Biology**. v.123, n.1, p.39-45, 2004.
- COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). **Journal of Biogeography**. v.39, p.724-738, 2012.
- DAMMANNAGODA, S. T., HURWOOD, D. A., MATHER, P. B. Evidence for fine geographical scale heterogeneity in gene frequencies in yellowfin tuna *Thunnus albacares* from the north Indian Ocean around Sri Lanka. **Fisheries Research**, v.90, p.147-157, 2008.
- FABRIN, T. M. C. et al. A utilização de marcadores na filogenia dos ciclídeos (teleostei: perciformes): uma análise cienciométrica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p.3118, 2014.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.R.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.
- FROUFE, E. et al. mtDNA sequence supports an Asian ancestry and single introduction of the common carp into the Danubian basin. **Journal of fish Biology**, v.61, n.1, p.301-304, 2002.
- GARCÍA, G.; WLASIUK, G.; LESSA, E. P. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.129, p.93-110, 2000.
- GOUIN, N. et al. Origin and colonization history of the White-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* in Ireland. **Heredity**, v.91, n.1, p.70-77, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.270, p.313-321, 2003.

HIRAYAMA, M., MUKAI, T., MIYA, M., MURATA, Y., SEKIVA, Y., YAMASHITA, T., NISHIDA, M., WATABE, S., ODA, S. & MITANI, H. Intraspecific variation in the mitochondrial genome among local populations of Medaka *Oryzias latipes*. **Gene**, v. 457, 13–24, 2010.

HURWOOD, D. A., ADAMSON, E. A. S., MATHER, P. B. Evidence for strong genetic structure in a regionally important, highly vagile cyprinid *Hemicorhynchus lobatus* in the Mekong river. **Ecology of Freshwater Fish**, v.17, p.273–283, 2008.

JIANG, L et al. Phylogenetic estimation of Sciaenidae in the East China Sea inferred from nuclear EPIC DNA sequence variation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.53, p.69–75, 2014.

KOCHER, T. D.; STEPIEN, C. A.; **Molecular systematics of fishes**. San Diego: Academic Press, 311p, 1997

LAURINDO, R.; MAFRA, T. Cienciometria da revista Comunicação & Sociedade identifica interfaces da área, **Comunicação & Sociedade**, n.53, p.233-260, 2010.

LI, B. et al. RNF213, a new nuclear marker for acanthomorph phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.50, p.345–363, 2009.

LI, C.H., RIETHOVEN, J.M., MA, L.B. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. **BMC Evol. Biol**, v.10, p.1471–2148, 2010.

LO PRESTI, R., GASCO, L., LISA, C., ZOCCARATO, I. & DI STASIO, L. PCR–RFLP analysis of mitochondrial DNA in tench *Tinca tinca*. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 401–407, 2010.

MACHADO, R. N. Análise cientométrica dos estudos bibliométricos publicados em periódicos da área de biblioteconomia e ciência da informação (1990 – 2005). **Perspectivas em Ciência da Informação**, v.12, n.3, p.2-20, 2007.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ciência da Informação**, v.27, n.2, p.134-140, 1998.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C. R. **Focus on Genome Research**. Nova York: Nova Science Publishers, 2004. p.335-363.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish In: BEAUMONT, A.R. (Ed). **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. London: Chapman e Hall, 1994. p.219-249.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: Promises and pitfalls. **PLoS Biology**, v.2, p.1529-1534, 2004.

MUSILOVÁ, Z.; SCHINDLER, I.; STAECK, W. Description of *Andinocara stalsbergi* sp.n. (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatini) from Pacific coastal rivers in Peru, and annotations on the phylogeny of the genus. **Vertebrate Zoology**, v.59, n.2, p.131-141, 2009.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. New York: John Wiley and Sons, 2006.

PANARARI-ANTUNES et al. Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in Neotropical regions. **Journal of Fish Biology**. v.80, p.2434-2447, 2012

PANARARI-ANTUNES, R. S., PRIOLI, A. J., PRIOLI, S. M. A. P., JULIO, H. F. JR., AGOSTINHO, C. S. & PRIOLI, L. M. Molecular variability in Brycon cf. pesu Muller and Troschel, 1845 (Characiformes:Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. **Genetics and Molecular Research** v. 7, p. 95–106, 2008.

PRIOLI, S. M. A. P. et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguac u river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.421–430, 2002

ROCHA, L. et al. Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.48, p.918-928, 2008.

RÜBER, L. et al. Evolutionary and biogeographic patterns of the Badidae (Teleostei: Perciformes) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.32, p.1010-1022, 2004.

SANTOS, S. et al. Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.66, p.423–428, 2013.

TORRES, R. A. Molecular taxonomy of *Plagioscion* Heckel (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia** v.23, p.1235-1242, 2006.

VERGARA-CHEN, C et al. A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the *Cynoscion* group (Pisces: Sciaenidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.53, p.602–607, 2009.

VIÑAS, J.; ALVARADO, B.; PLA, C. Phylogeography and phylogeny of the epimeric cosmopolitan bonitos of the genus *Sarda* (Courvier): inferred patterns of intra- and inter-oceanic connectivity derived from nuclear and mitochondrial DNA data. **Journal of Biogeography**, v.37, p.557-570, 2010.

YAN, J. et al. Maternal inheritance in polyploid fish inferred from mitochondrial ATPase genes analysis. **Prog. in Nat. Sci.**, v.19, p.693–698, 2009.

ANEXO 1

Publicatio UEPG, Ciências Biológicas e da Saúde

Diretrizes para Autores

1. DAS NORMAS GERAIS

1.1 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (ISSN 1676- 8485), destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa básica e aplicada. A maioria das páginas da revista é reservada para: pesquisa original; observações clínicas com análise e discussão; relatos de casos ou reuniões clínicas, com discussões; estatísticas epidemiológicas, com análises e discussões; descrições ou avaliações de métodos ou procedimentos nas áreas de Ciências Biológicas e da Saúde. São aceitos artigos de revisão e comunicações breves.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva todos os direitos autorais do trabalho publicado, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução com devida citação de fonte.

1.3 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde receberá para publicação trabalhos redigidos em português e/ou inglês, ficando os textos dos mesmos sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião dos Editores Associados e do Corpo de Consultores.

1.4 Deverão constar, no final dos trabalhos, e-mail dos autores, e colaboradores.

1.5 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva o direito de submeter todos os originais à apreciação do Editor Associado e Corpo de Consultores, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência ou não da publicação, podendo, inclusive rerepresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas editoriais da Revista. Nesse caso, o referido trabalho será reavaliado pelos consultores.

1.6 Caberá a cada autor de artigo, um exemplar da revista, como única indenização por direitos autorais.

1.7 Não serão publicadas fotos coloridas, a não ser em casos de absoluta necessidade e a critério da comissão editorial, com custos para os autores.

1.8 Todos os trabalhos que envolvam estudo com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos,

deverão estar de acordo com as normas internacionais para pesquisa em seres humanos.

2. DA APRESENTAÇÃO DO ORIGINAL

Publicatio UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde

Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences

ESCLARECIMENTOS E NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde deverão ser redigidos de acordo com as seguintes normas:

2.1 Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial e digitados em folhas de papel tamanho A4 (210 mm X 297 mm com espaço 1,5cm e margem de 3cm de cada um dos lados, e margens superior e inferior 2,5cm perfazendo o total de no máximo 30 páginas, incluindo as ilustrações (gráficos, tabelas, fotografias etc.). Utilizar fonte Times New Roman, tamanho 12, exceto para notas de rodapé e título que deverão apresentar corpo 9 e 14 respectivamente.

2.2 Ilustrações:

- devem ser de boa qualidade;
- em separado do texto, numeradas em algarismos arábicos.;
- legendas em folha à parte com indicação do local aproximado de inserção no corpo do texto;
- figuras digitais devem ser apresentadas em JPG - 300 dpi de resolução em CD);
- gráficos devem ser apresentados no programa Excel ou no Word;
- mantendo as devidas proporções, usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm x 23,5 cm.

2.3 Tabelas e quadros

- legendas serão colocadas na parte superior. Numeradas em algarismos arábicos, conforme norma ABNT NBR 14724 de 17/03/2011.
- usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm.

2.4 As notas devem ser reduzidas ao mínimo e digitadas em pé de página, numeradas a partir de 1. Se houver nota no título, ela receberá asterisco e não numeração. As notas não devem ser utilizadas para referência bibliográfica. Estas devem ser feitas no corpo do trabalho.

2.5 Recomenda-se anotar, no texto, os nomes compostos e dos elementos, ao invés de suas fórmulas ou símbolos; preferencialmente, os períodos de tempo, também por extenso, ao invés de números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica, por extenso e sublinhados, ao invés de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos, conforme as regras internacionalmente aceitas e os símbolos métricos, de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.6 No preparo do original, deverá ser observada a seguinte estrutura:

a) Cabeçalho:

Título do artigo e subtítulo (quando os artigos forem em PORTUGUÊS, colocar título e subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em INGLÊS, colocar título e subtítulo em inglês e português).

Nome do(s) autor(es) - Com indicação da instituição de origem. Endereço, e-mail, telefone e fax do autor principal, e e-mail dos demais autores.

b) Resumo

Consiste na apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, em no máximo 250 palavras.

c) Palavras-chave- Correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

d) Abstract- Consiste na apresentação concisa, em inglês, dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, e deve conter, no máximo, 250 palavras.

e) Keywords- Correspondem às palavras ou expressões em inglês que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

f) Texto- Introdução, material e método, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos (quando houver).

g) Referências- Observar a norma ABNT para as referências NBR-6023/2002. As referências deverão estar ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor. As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com as normas internacionais.

Obs.: A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas, mas citados em notas de rodapé.

Alguns exemplos de referências bibliográficas:

Livro com um autor:

SANTI, V.

Livro com dois autores, elencar os nomes:

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R.

Livro com três autores, elencar os nomes conforme a ordem que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula:

ALMEIDA, J. C.; VARGAS, F.; LOBATO, M. L.

Mais de três autores, indica-se apenas o primeiro, seguido da expressão "et al."

CORREA, C. P. et al.

Capítulo de livro

STAHL, S. S. Marginal lesion. In: GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Periodontal therapy**. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1973. p. 94-98.

Tese

JANSEN, J. L. **Modificação da superfície de partículas sólidas através de tensoativos não iônicos em solução aquosa**: adsolubilização de esteróides, ácidos barbitúricos e outras moléculas ativas. Paris, 1995. 734 p. Tese (Doutorado em) - Université de Paris-Sud.

Artigo de periódico

TAKEDA, I. J. M.; GUERRERO, R. T. Fungos endófitos do gênero *Xylaria* em *Ilex paraguariensis* St. Hil (Aquifoliaceae). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.1, n.3, p.109-125, 1997.

CAPÍTULO 2

Estimativa da diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) por meio de análise de sequências dos genes mitocondriais ATPase 6/8

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Journal of Fish Biology*. Disponível em: <<http://www.wiley.com/bw/submit.asp>>

Estimativa da diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) por meio de análise de sequências dos genes mitocondriais ATPase 6/8

Considera-se que *Plagioscion squamosissimus* seja uma espécie nativa da bacia Amazônica, Tocantins e do Parnaíba e que foi introduzida em reservatórios do Nordeste do Brasil e na bacia do Paraná. Estudos que utilizam ferramentas moleculares buscam estabelecer relações filogenéticas e avaliar a variabilidade genética desta espécie. O principal propósito deste trabalho foi avaliar as relações genéticas de *P. squamosissimus* de cinco bacias hidrográficas brasileiras onde a espécie é nativa ou introduzida, utilizando sequências nucleotídicas mitocondriais. Foram obtidas sequências do gene ATPase 6/8 com 816 pares de bases de 79 indivíduos provenientes das bacias do rio São Francisco, alto rio Paraná, rio Parnaíba e rio Tocantins. Além disso, sequências de 63 espécimes provenientes da bacia Amazônica, disponíveis no *Genbank* também foram utilizadas nas análises. De todas as sequências analisadas foram identificados 82 haplótipos. Os resultados revelaram que a população da bacia do rio Tocantins é mais basal do que as populações da Amazônia e da bacia do Parnaíba. Ficou demonstrado que *P. squamosissimus* da bacia do rio São Francisco e da Bacia do rio Paraná tem origem na população do rio Parnaíba e os resultados descartam a hipótese da população do rio Parnaíba ser oriunda da população do rio Tocantins. Além disso, as pequenas diferenças entre haplótipos da população do rio Parnaíba sugerem gargalo e expansão demográfica recente. Finalmente, ficou demonstrado que o gene ATPase 6/8 é útil para avaliar a diversidade genética entre populações de *Plagioscion squamosissimus* de diferentes bacias hidrográficas.

Palavras-chaves: Biogeografia, Marcadores moleculares, Peixe, Variabilidade genética.

INTRODUÇÃO

Os peixes do gênero *Plagioscion* são originalmente encontrados nos rios Magdalena, Amazonas, Orinoco, Essequibo e parte baixa do rio Paraná e rios das Guianas (Casatti, 2003). Existem cinco espécies nominais válidas atribuídas a este gênero: *P. squamosissimus*, *P. auratus*, *P. magdalenae*, *P. ternetzi* e *P. montei* (Casatti, 2005).

A corvina *P. squamosissimus* (Heckel, 1840) está naturalmente distribuída pelas bacias do Orinoco, Amazonas, Guianas e Parnaíba, tendo sido introduzida em reservatórios artificiais do Nordeste e nas bacias dos rios São Francisco e alto rio Paraná (Fontenele & Peixoto, 1978; Torloni *et al.*, 1993; Casatti, 2005).

A partir de 1933, o Departamento Nacional de obras Contra as Secas (DNOCS) introduziu espécimes de *P. squamosissimus* nos açudes do nordeste (Fontenele & Peixoto, 1978). Na bacia do rio Paraná, *P. squamosissimus* foi introduzido em meados da década de 60 (Torloni *et al.*, 1993), supostamente com o objetivo de melhorar a pesca, mas durante as últimas três décadas tornou-se invasivo e tem praticamente colonizado todos os habitats da

bacia (Agostinho *et al.*, 2004, 2008). *Plagioscion squamosissimus* é um predador voraz, e tornou-se uma séria ameaça para a ictiofauna local (Agostinho *et al.*, 2004) e, ao mesmo tempo, se transformou em uma espécie altamente importante para a pesca comercial na bacia do rio Paraná (Torloni *et al.*, 1993; Petrere *et al.*, 2002).

Plagioscion squamosissimus pode alcançar até oitenta centímetros de comprimento (Casatti, 2003), possui hábitos alimentares variáveis desde a insetivoria até a piscivoria generalista (Santos *et al.*, 1995), tendo demonstrado na bacia do rio Paraná, hábitos piscívoros (Hahn *et al.*, 1997). A espécie é característica de ambientes lênticos (Torloni *et al.*, 1993) ocupando a região pelágica do rio Paraná (Baumgartner, 1995). A dieta variada de *Plagioscion squamosissimus* pode levar a sobreposição com a dieta de outras espécies, assim como pode haver competição por locais de desova (Agostinho & Júlio Jr., 1996).

Cooke *et al.* (2012) buscaram esclarecer a história filogeográfica intra-específica de *P. squamosissimus* e concluíram que a adaptação de Sciaenidae para a água doce tem persistido ao longo do tempo e, provavelmente, continua como um mecanismo de diversificação dentro de populações contemporâneas de *P. squamosissimus* em gradientes hidroquímicos de água doce dentro da bacia Amazônica.

Verificou-se recentemente que *P. squamosissimus*, invasiva para a bacia do rio Paraná, foi derivada de uma população nativa da bacia do rio Parnaíba (Panarari-Antunes *et al.*, 2012). Como discutido por Fontenele & Peixoto (1978) e Torloni *et al.* (1993) espécimes nativos de *P. squamosissimus* foram amostrados na bacia do Rio Parnaíba, em dois pequenos lagos conectados conhecidas como Lagoa de Nazaré e Lagoa da Feitoria, que são ligados aos rios Piauí e Canindé. Quanto ao isolamento geográfico das espécies nativas do Parnaíba e do Tocantins, elas acumularam divergências genéticas e evoluíram de forma independente, como inferido pelo polimorfismo do seu DNA mitocondrial (Panarari-Antunes *et al.*, 2012).

Estudos que utilizam ferramentas moleculares buscam estabelecer relações filogenéticas e avaliar a variabilidade genética desta espécie (Panarari-Antunes *et al.*, 2012; Cooke *et al.*, 2012). No entanto, a filogenia e a biogeografia das populações de *P. squamosissimus* nativas das bacias do Parnaíba, Amazônica e Tocantins e das populações introduzidas no alto rio Paraná e rio São Francisco ainda não foram elucidadas.

Recomenda-se o uso de ferramentas moleculares em qualquer estudo em que a riqueza de espécie precisa ser testada e para assegurar se as amostras de determinados locais representam efetivamente espécies nativas ou invasoras (Torres, 2006). Marcadores moleculares tornaram-se ferramentas valiosas para a genética de populações, biologia da conservação e estudos de evolução (Liu & Cordes, 2004). Marcadores do DNA mitocondrial

são amplamente utilizados para determinar a variação genética interespecífica e intraespecífica, bem como estudos de biogeografia, filogenia, etc (Awise, 1998). O gene mitocondrial ATPase subunidades 6 e 8 tem sido utilizado para determinar a variação intraespecífica para várias espécies de peixes, inclusive na ordem Perciformes (Chow & Ushiyama, 2004; Dammannagoda *et al.*, 2008; Vergara-Chen *et al.*, 2009).

O principal propósito deste trabalho foi avaliar a variabilidade, estrutura genética e compreender a biogeografia de populações de *Plagioscion squamosissimus* nativas da bacia do Parnaíba, Tocantins e Amazonas e de populações introduzidas na bacia do alto rio Paraná e rio São Francisco, através do uso do marcador mitocondrial ATPase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de *Plagioscion squamosissimus* foram coletados na planície de inundação do alto rio Paraná, nas proximidades do município de Porto Rico (PR); na bacia do rio Parnaíba, no estado do Piauí, foram realizadas coletas nas localidades de Mesa da Pedra, lagoa da Porta (Miguel Alves) e lagoa de Nazaré (Nazaré do Piauí); na bacia do rio Tocantins, nas localidades de Peixe, Porto Nacional e Ipueiras, e na bacia do rio São Francisco (Tabela I e Figura 1). Após a coleta, os indivíduos foram fixados em álcool etílico comercial para preservação e armazenados a -20° C. Além disso, foram utilizadas sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank* referentes a populações dos rios Amazonas, Solimões e Negro, da bacia Amazônica.

O DNA total das amostras foi extraído com a metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi *et al.*, 1998). As amostras foram homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e proteinase K (20 μ g/ μ L) por 2 h em banho-maria a 37° C. Em seguida o DNA foi lavado com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado para a sua purificação. Após, o tubo foi suavemente invertido para precipitar o DNA e a suspensão foi centrifugada por 10 min a 12.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet*, após ser lavado com etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min e estar completamente seco, foi ressuscitado em 50 μ L de tampão TE diluído 10 vezes (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) com RNase (20 μ g/mL). O DNA foi assim armazenado em *freezer* a -20° C.

Tabela I. Locais de coleta e número de espécimes de *Plagioscion squamosissimus* coletadas em cada bacia hidrográfica.

Bacia hidrográfica	Local de Coleta	Coordenadas geográficas	Número de amostras
Parnaíba	Lagoa de Nazaré no Rio Parnaíba, próximo à Nazaré do Piauí (LN).	07° 00' S 42° 39' W	25
	Lagoa da Porta e Lagoa do Meio no Rio Parnaíba, próximo a Miguel Alves (MA).	04° 02' S 42° 49' W	
	Reservatório de Mesa da Pedra no Rio Poty (MP).	06° 10' S 41° 58' W	
Tocantins	Rio Tocantins, próximo a Peixe (Px To)	11° 52' S 48° 35' W	22
	Reservatório de Lajeado, Rio Tocantins próximo a Porto Nacional (Pn To)	10° 37' S 48° 24' W	
	Rio Tocantins próximo ao Município de Ipueiras (Ipu To)	11° 14' S 48° 27' W	
	Rio Santa Tereza próximo a Peixe (Px St)	08° 58' S 48° 10' W	
Alto rio Paraná	Rio Baía e planície de inundação do Alto Rio Paraná próximo a Porto Rico (PR)	22° 47' S 53° 19' W	20
São Francisco	Rio São Francisco, próximo a Juazeiro na Bahia e Petrolina, Pernambuco.	09° 27' S 40° 35' W	11
Amazonas	<i>Genbank</i>		63
Total			141

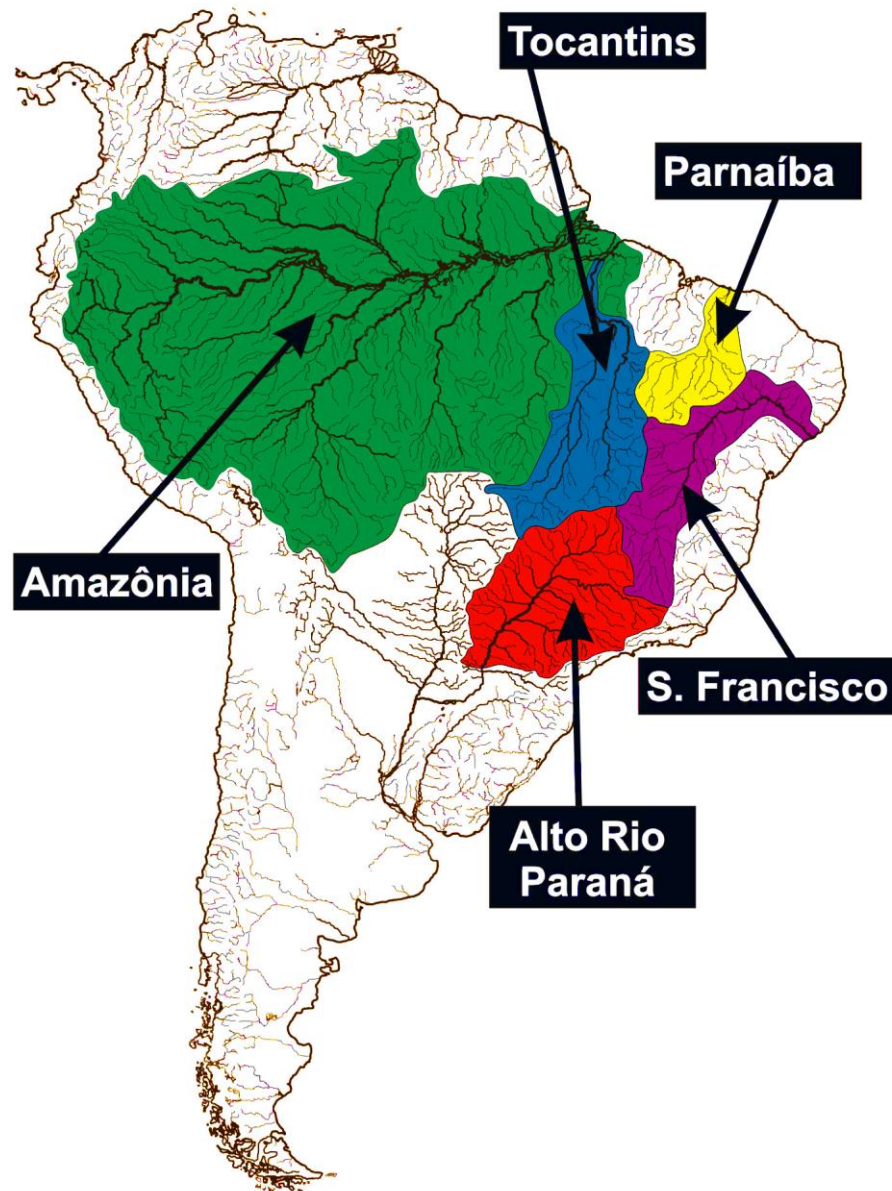


Figura 1. Bacias hidrográficas brasileiras onde foram coletadas espécimes de *Plagioscion squamosissimus* estudadas neste trabalho.

Para a quantificação e avaliação da qualidade do DNA, uma alíquota de cada amostra extraída foi comparada visualmente com uma amostra conhecida de DNA λ . Para isso foi utilizado gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,2 $\mu\text{g}/1\text{ mL}$) e fotografado por um sistema de EDAS 290 (*Kodak 1D Image Analysis 3.5*).

O *locus* mitocondrial ATPase foi amplificado de acordo com Corrigan *et al* (2008). As reações de PCR foram concebidas com 23 μL de volume total, contendo 40 ng de DNA molde e 2,5 μM de cada primer. As amplificações por PCR do *locus* ATPase iniciaram com 94 °C durante 5 minutos. Cada ciclo foi um ciclo “touchdown” de 61° C a 53°C para a temperatura de anelamento com menos 2°C/ciclo, 94°C por 30 s para desnaturação, 61°C – 53°C por 30 s

para anelamento e 72°C por 1 min para extensão. Vinte e oito ciclos foram realizados a 53 °C, seguido por uma extensão final passo de 72 °C durante 5 min. Os produtos do PCR foram purificados e a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit Big Dye Terminator. A determinação da sequência dos nucleotídeos foi procedida em sequenciador automático MegaBace (Amersham) seguindo instruções do fabricante.

As sequências nucleotídicas com confiabilidade superior a 90% foram editadas manualmente com o programa BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999) e alinhadas em Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) utilizando o programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). As sequências foram analisadas através do programa Mega 6, utilizando os critérios de Akaike (*Corrected Akaike Information Criterion -AICc*) e bayesiano (*Bayesian Information Criterion - BIC*). Todas as sequências parciais obtidas e analisadas serão posteriormente depositadas no *GenBank*.

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram estimados usando o programa DnaSP 5.1 (Librado & Rozas, 2009). No DnaSP também foram selecionados os haplótipos de cada espécime e gerados os bancos de dados para as análises no Arlequim 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) e Network 4.6.1.3 (Fluxus technology, 2004-2015). A composição das sequências, índices de diversidade molecular, índice de fixação (F_{ST}) e análise de variância molecular (AMOVA) foram calculados utilizando o programa Arlequim 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010). Para verificar a distribuição espacial dos haplótipos em todas as populações foi construída uma rede de haplótipos através do método de vetores medianos no programa Network 4.6.1.3 (Fluxus technology, 2004-2015).

As análises filogenéticas foram baseadas nos algoritmos *neighbor-joining* (“união-de- vizinhos”; NJ) com suporte de 10.000 reamostragens de *bootstrap* (reamostragens) e *maximum-likelihood* (“máxima-verossimilhança”; ML) com 1.000 reamostragens *bootstrap*. A construção das árvores *neighbor-joining* e de máxima-verossimilhança foi realizada com o programa Mega 6.

RESULTADOS

Foram obtidas sequências com 816 pb dos genes mitocondriais ATPase 8 e ATPase 6 de 141 indivíduos da espécie *Plagioscion squamosissimus* de cinco bacias hidrográficas brasileiras onde a espécie é nativa ou introduzida (Figura 1). Foram identificados 71 sítios polimórficos e suas mutações corresponderam a 74 substituições, sendo elas 51 transições e 23 transversões. De todas as sequências analisadas, foram identificados 82 haplótipos, sendo

que destes 73 foram haplótipos únicos. O H12 foi o haplótipo mais frequente, compartilhado por 44 indivíduos de 3 localidades diferentes. A população do Tocantins possui 12 haplótipos exclusivos, a Amazônia 63, o Parnaíba quatro e o Paraná dois. Três haplótipos são compartilhados por Parnaíba, Paraná e São Francisco. (Tabela II).

Tabela II. Distribuição dos 82 haplótipos de *Plagioscion squamosissimus* associados às bacias hidrográficas. Os haplótipos H20 até H82 foram únicos e exclusivos da Amazônia.

Haplótipos	Amazonas	Paraná	Parnaíba	Tocantins	São Francisco	Total
H1				2		2
H2				1		1
H3				3		3
H4				2		2
H5				2		2
H6				4		4
H7				4		4
H8				1		1
H9				2		2
H10				1		1
H11			2			2
H12		16	16		11	43
H13			1			1
H14			1			1
H15			1			1
H16		1	3			3
H17		1	1			2
H18		1				1
H19		1				1
H20	1					1
H21	1					1
H22	1					1
.
.
.
H80	1					1
H81	1					1
H82	1					1
TOTAL	63	20	25	22	11	141

A frequência média dos quatro nucleotídeos para todas as amostras de *Plagioscion squamosissimus* foi C: 33,97%; T: 28,38%; A: 25,63%; G: 12,02%.

O índice de diversidade haplotípica (h) para os todos os indivíduos das cinco populações estudadas foi de 0,898 enquanto o índice de diversidade nucleotídica (π) foi 0,00953. A diversidade haplotípica e nucleotídica foi maior na população Amazônica e nula na população do rio São Francisco (Tabela III). Entre as populações nativas, Parnaíba apresentou a menor diversidade nucleotídica, aproximadamente 30% da encontrada em Tocantins e 14% da diversidade nucleotídica detectada na Amazônia.

Tabela III: Índice de diversidade haplotípica e nucleotídica para as populações de *Plagioscion squamosissimus* estudadas.

População	Nº amostras sequenciadas	Nº haplótipos	Diversidade Haplotípica (h)	Diversidade Nucleotídica (π)
Amazonas	63	63	0,992 \pm 0,001	0,007640 \pm 0,0041
Paraná	20	5	0,278 \pm 0,092	0,00036 \pm 0,0004
Parnaíba	25	7	0,575 \pm 0,077	0,00107 \pm 0,0009
Tocantins	22	10	0,897 \pm 0,019	0,00341 \pm 0,0021
S. Francisco	11	1	0,000 \pm 0,000	0,00000 \pm 0,0000
Total	141	82		

A análise de variância molecular revelou que de toda variabilidade genética observada, 62,94% foi entre as populações e 37,06% foi dentro das populações. O índice de fixação (F_{st} : 0,62888) indica diferenciação entre as populações em um nível de significância de 0,05 (Tabela IV).

Tabela IV: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações de *Plagioscion squamosissimus* de todas as bacias hidrográficas estudadas.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre populações	306,462	2,9568	62,94**
Dentro das populações	236,743	1,7408	37,06
Total	543,206	4,6976	
Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,6294**			

** = $P < 0,01$

Os resultados de F_{ST} entre as populações tomadas duas a duas (Tabela V), indicam que a população do Tocantins está significativamente diferenciada de todas as outras populações estudadas, assim como, a população da Amazônia difere de todas as populações estudadas. Em contraste, as populações do Parnaíba, Paraná e São Francisco não estão diferenciadas entre si, mas diferem das populações da Amazônia e do Tocantins. Fica claro que a população da Amazônia difere de todas as outras por F_{ST} pouco superior a 0,5. Entretanto, a população do Tocantins difere da população amazônica com $F_{ST}=0,5404$, mas difere das populações Parnaíba, Paraná e São Francisco por valores de F_{ST} superiores a 0,85. Fica evidente que a população do Tocantins está mais próxima da população da Amazônia do que da população nativa da bacia do Parnaíba. Apesar disso, a população da Amazônia está mais próxima geneticamente da população do Parnaíba do que da população de Tocantins.

Tabela V. Índice de fixação (F_{ST}) entre os pares de populações de *P. squamosissimus* baseado em sequências nucleotídicas do gene mitocondrial ATPase 6/8

	Tocantins	Parnaíba	S. Francisco	Paraná	Amazonas
Tocantins	—				
Parnaíba	0,8546*	—			
S. Francisco	0,8512*	0,0155ns	—		
Paraná	0,8733*	0,0030ns	-0,0334ns	—	
Amazonas	0,5403*	0,5412*	0,5186*	0,55214*	—

* = $P < 0,05$; ns = $P > 0,05$

O melhor modelo selecionado para a reconstrução filogenética foi TN93+G. Ambas as árvores geradas pelos algoritmos *neighbor-joining* (Figura 2 A) e máxima verossimilhança (Figura 2 B) foram congruentes para gerar três grandes clados. As populações do Tocantins aparecem como um grupo basal e as populações de São Francisco, Paraná e Parnaíba forma um único grupo, próximo ao clado da população da bacia Amazônica.

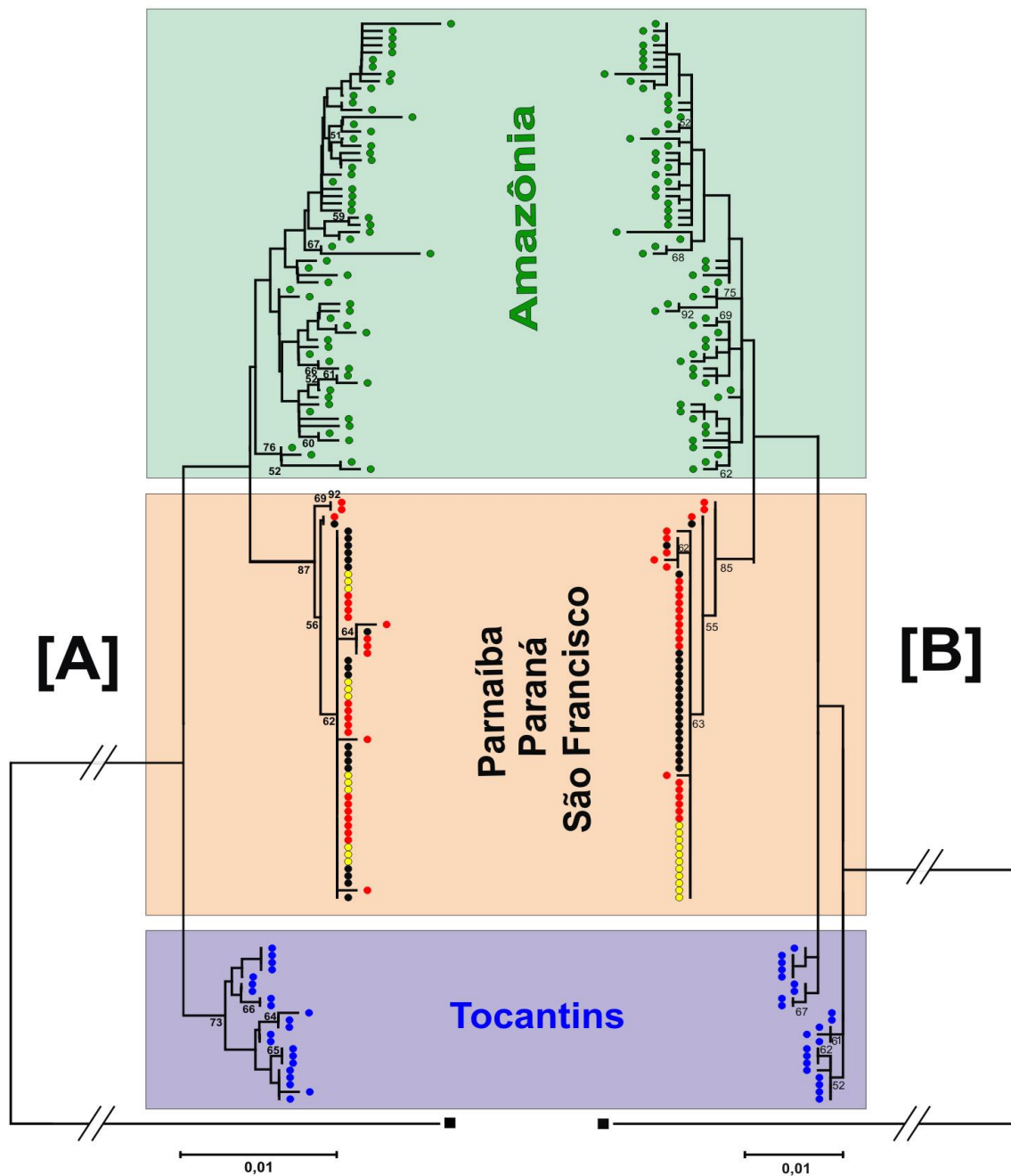


Figura 2. Árvores construídas a partir de sequências ATPase 6/8 de populações de *P. squamosissimus*, com os algoritmos [A] *Neighbor-Joining* modelo TN 93 + G, com 10.000 reamostragens de bootstrap e [B] Máxima-Verossimilhança, com 1.000 reamostragens de bootstrap. *Plagioscion ternetzi* foi utilizado como grupo externo.

Os resultados da rede de haplótipos gerados pelo programa network demonstram que há um grupo formado pelos haplótipos exclusivos de indivíduos do Tocantins, outro grupo formado por haplótipos compartilhados por indivíduos do Parnaíba, São Francisco e Paraná e outros dois grupos formados por haplótipos da população Amazônica (Figura 3). No gráfico são nítidos quatro haplogrupos, correspondentes às populações da Amazônia, Tocantins e do

conjunto Parnaíba/Paraná/São Francisco. A forte diferenciação pode ser visualizada pela ausência de haplótipos intermediários entre os haplogrupos.

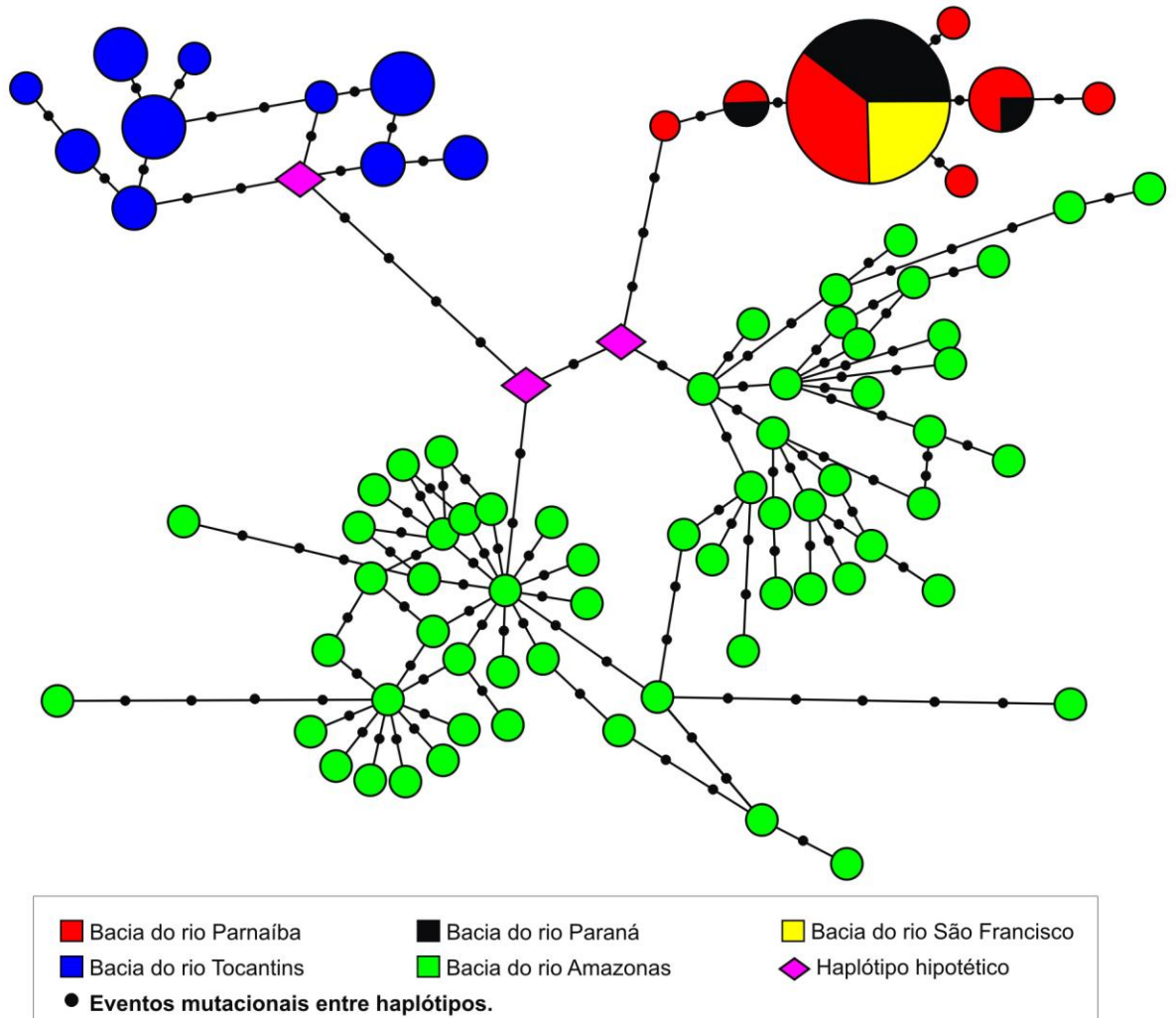


Figura 3. Rede de haplótipos de *P. squamosissimus* encontrados nas bacias Amazônica, Parnaíba, Paraná, São Francisco e Tocantins, baseado em sequências do gene mitocondrial ATPase 6/8.

DISCUSSÃO

Os Siluriformes e Characiformes atuais constituem testemunhos da antiguidade e origem comum de parte das ictiofaunas sul-americana e africana (Lundberg, 1998; Reis *et al.*, 2003). Além de grandes grupos de peixes de água doce presentes na América do Sul desde os primórdios da formação do continente, outros grupos foram incorporados posteriormente. Durante o Terciário, ocorreram diversas incursões marinhas no continente sul-americano que criaram gradientes de salinidade e propiciaram a adaptação de diversos grupos de peixes

marinhos ao ambiente de água doce (Lovejoy et al., 2006; Lundberg, 1998). Com base em dados fósseis e moleculares, alguns autores propõem que scianídeos se adaptaram e colonizaram ambientes de água doce em um ou mais eventos independentes no Oligoceno superior e Mioceno inferior, entre 30 e 20 milhões de anos (Monsch, 1998; Boeger & Kritsky, 2003; Cooke et al., 2012). Segundo os resultados moleculares de Cooke et al. (2012), a especiação de *P. squamosissimus* ocorreu a menos de 10 milhões de anos. Portanto, qualquer hipótese sobre a dispersão e a diversidade de *P. squamosissimus* para as bacias atualmente ocupadas pela espécie deve considerar esse tempo de existência da espécie.

A página www.fishbase.org (acessada em 13/02/2015) registra *P. squamosissimus* como sendo restrita à América do Sul e com distribuição nas bacias Amazônica, Orinoco, Paraná, São Francisco e rios das Guianas. Não faz menção à ocorrência de *P. squamosissimus* na bacia do rio Parnaíba. No entanto, a população de *P. squamosissimus* contida na drenagem do rio Parnaíba deve ser considerada importante, pois parece que é a população dessa espécie com maior repercussão sobre a ictiofauna neotropical fora da Amazônia (Agostinho & Júlio Jr., 1996), além de ser relevante economicamente nas regiões onde foi introduzida (Petriere et al., 2002). De acordo com nossos resultados e conforme relatado por Torloni et al. (1993), a população de corvina introduzida no alto rio Paraná e que se dispersou para o baixo rio Paraná é originária da população da bacia do rio Parnaíba.

O trabalho de Panarari-Antunes et al. (2012) demonstrou que na bacia do rio Paraná ocorrem apenas descendentes de *P. squamosissimus* da bacia do Parnaíba e sem parentesco com as populações amazônicas.

Os resultados do presente trabalho revelam que a população do rio São Francisco também é originária da bacia do Parnaíba. Como pode ser constatado na Tabela II e Figura 4, na amostragem do São Francisco foi detectado somente um haplótipo. Este haplótipo existe na bacia do Parnaíba e foi transferido para o rio São Francisco. Além disso, na bacia do São Francisco não foram encontrados haplótipos oriundos da bacia Amazônica. Essa informação torna ainda mais visível a influência da população de *P. squamosissimus* da bacia do rio Parnaíba sobre ecossistemas além dos limites da drenagem onde é nativa.

Persiste, ainda, a questão da origem da população de *P. squamosissimus* nativa da bacia do rio Parnaíba. Com os dados disponíveis não é possível definir a rota de migração para a colonização da bacia do Parnaíba. No entanto, frente às informações moleculares e geológicas disponíveis, algumas considerações especulativas parecem pertinentes.

Uma primeira ideia, que poderia parecer promissora, seria admitir a sua origem a partir da população de *P. squamosissimus* residente na bacia do rio Tocantins. É natural que

essa hipótese seja aventada diante da localização da bacia do Parnaíba, como pode ser visto na Figura 1. As bacias do Parnaíba e do Tocantins são contíguas. Além disso, atualmente a população de *P. squamosissimus* geograficamente mais próxima do Parnaíba está na bacia do Tocantins. Entretanto, essa hipótese enfrenta sérios problemas quando se considera algumas informações obtidas neste trabalho e informações geológicas disponíveis anteriormente. O exame dessas informações revelará a dificuldade para a aceitação da hipótese de origem a partir da população bacia do rio Tocantins.

A bacia do Tocantins algumas vezes é considerada parte da Amazônia e outras vezes como uma bacia independente. De qualquer forma, por desaguar na foz do rio Amazonas, a bacia do Tocantins não está estritamente isolada da bacia Amazônica e as duas regiões compartilham muitas espécies de peixes, pois das 554 espécies descritas cerca de 150 são endêmicas (Ruiz, 2009). Muitas outras espécies encontradas também ocorrem na bacia Amazônica e algumas também ocorrem em outras bacias hidrográficas. Apesar da possibilidade de fluxo gênico entre populações de peixes da Amazônia e do Tocantins, os resultados obtidos mostram que as populações de *P. squamosissimus* das duas bacias estão altamente diferenciadas. Além de não compartilharem haplótipos, os respectivos haplogrupos estão distantes por $F_{ST}=0,5404$. A combinação de alto F_{ST} com haplótipos exclusivos de cada população indica isolamento antigo e sem fluxo gênico.

A comparação das populações de Tocantins com Parnaíba revela situação ainda mais extrema. A diferenciação encontrada, com $F_{ST}=0,8546$, e a falta de haplótipos em comum revelam que o isolamento entre estas duas populações é ainda mais antigo do que entre as populações do Tocantins e Amazônia. Essa condição é até esperada, em função do isolamento físico representado pelos limites da drenagem do Parnaíba, que impede o fluxo gênico por migração entre bacias. No entanto, é surpreendente que a diferenciação entre as populações Parnaíba e Amazônica ($F_{ST}=0,5412$) seja aproximadamente 35% inferior ao encontrado para Tocantins e Amazônia.

A inspeção das árvores filogenéticas construídas permite a verificação de que a população do Tocantins ocupa uma posição mais basal, mais próxima do grupo externo *P. ternetzi* do que as populações da Amazônia e do Parnaíba. Essa condição mais basal constitui forte evidência de que a população do Tocantins é mais antiga do que as outras populações analisadas neste estudo, em confronto com os dados moleculares apresentados por Cooke *et al.* (2012).

Estes resultados indicam que as populações da Amazônia e Parnaíba são derivações mais recentes do que a população do Tocantins. Cooke *et al.* (2012) propuseram que a

especiação de *P. squamosissimus* ocorreu no noroeste da América do Sul e que a dispersão e expansão demográfica ocorreu depois de completada a formação do rio Amazonas, a aproximadamente 2,5 milhões de anos (Campbell et al., 2006). Essa população ancestral teria se dispersado e colonizado diversas regiões. Admitindo-se essa trajetória, pode-se supor que a população ancestral, antes da dispersão, estaria mais próxima da atual população da bacia do Tocantins do que da atual população da Amazônia. Como consequência, as subpopulações ancestrais que ocuparam a Amazônia teriam sido substituídas por população derivada mais recentemente que passou por novo período de expansão demográfica.

Mas é preciso ter em mente que, apesar de ser mais recente, esse evento de recolonização da Amazônia seria muito antigo. Basta verificar que os haplótipos do haplogrupo Amazônico são numerosos e diferem entre si por um ou vários nucleotídeos. O acúmulo de diferenças nucleotídicas entre haplótipos aparentados demanda tempo. Isso tem reflexos sobre as diversidades haplotípicas e nucleotídicas. Alta diversidade haplotípica e alta diversidade nucleotídica, como observado na população amazônica, sugerem longa história evolutiva (Grant & Bowen, 1998).

Por alguma razão, a população do Tocantins teria permanecido isolada, sem contato genético com as populações substitutas e mais recentes que ocuparam a Amazônia. Embora a bacia do Tocantins não esteja isolada de forma evidente, barreiras ecológicas que não são facilmente identificáveis podem impedir o livre trânsito de indivíduos e, por consequência, o fluxo gênico. Esse isolamento permaneceu efetivo por período muito longo, o suficiente para que se instalasse diferenças haplotípicas profundas, como as que foram observadas entre as populações do Tocantins com todas as outras populações.

As populações da Amazônia e do Parnaíba são mais aparentadas entre si do que com a população do Tocantins. Portanto, a separação dessas duas populações teria acontecido mais recentemente, a partir de uma população evoluída a partir da população ancestral que colonizou a Amazônia e Tocantins. Essa suposição é confirmada pelas posições nas árvores filogenéticas das populações da Amazônia e Parnaíba. Portanto, a população do Parnaíba também teria sido derivada mais recentemente do que a atual população da bacia do rio Tocantins.

Esse conjunto de informações discutido dificultam enormemente a aceitação da hipótese de origem da população da bacia do Parnaíba a partir da população atual da bacia do Tocantins. Essa dificuldade é agravada ainda mais pela história geológica da bacia do rio Parnaíba. Santos e Carvalho (2004) relatam que a formação da bacia do Parnaíba é muito antiga, datando da Era Paleozóica. Segundo os autores, as investigações geológicas na região

evidenciam que no Permiano foram encerradas as ligações entre as bacias Amazônica e do Parnaíba. É claro que ainda se pode aventar a hipótese de que, após a dispersão da população ancestral de *P. squamosissimus* a partir do noroeste da América do Sul, capturas de cabeceiras de rios poderiam ter introduzido a espécie na bacia do Parnaíba.

Aparentemente, essa possibilidade pode ser descartada de imediato, pois o parentesco maior com a população da bacia Amazônica sugere que a rota de chegada de *P. squamosissimus* à bacia do rio Parnaíba deve ter sido outra. Uma possibilidade seria uma trajetória de colonização passando pelas bacias costeiras. Com o abaixamento e elevação do nível do mar durante e entre glaciações, as bacias costeiras poderiam se unir e se separar sucessivamente. Essa poderia ser uma rota de chegada de *P. squamosissimus* até a bacia do Parnaíba. Mas, até o momento não se tem evidências dessa migração e outros estudos devem ser realizados para um possível esclarecimento.

A baixa diversidade nucleotídica da população do rio Parnaíba, com haplótipos diferindo por uma ou duas bases apenas, permite duas interpretações. Primeiro, a colonização pode ter sido recente, com pouco tempo para o acúmulo de mutações. Nesse caso, ficaria difícil identificar a população doadora, já que as diferenças com a atual população Amazônica são acentuadas. A segunda interpretação seria admitir que a colonização é antiga, a partir da população da Amazônia. Após longo período de isolamento geográfico, sem fluxo gênico, em um tempo mais recente a população do Parnaíba teria passado por um gargalo seguido de expansão demográfica. Talvez a ampliação dos locais de amostragens, incluindo outras bacias, possa contribuir para a elucidação dessa questão.

O presente estudo revelou diversidade genética entre as populações de *P. squamosissimus* estudadas, indicando que as populações do Tocantins e Parnaíba foram originadas a partir de espécimes da bacia Amazônica que se dispersaram para essas duas bacias, em eventos distintos e em tempos diferentes. Os resultados também confirmam que *P. squamosissimus*, introduzida na bacia do São Francisco e do alto rio Paraná foi trazida da bacia do rio Parnaíba. Portanto, a presente análise gerou informações que confirmam a diferenciação de *P. squamosissimus* e contribui para o delineamento de ações voltadas para a conservação deste recurso pesqueiro. E também evidencia que o gene ATPase 6/8 é útil para a avaliar a variabilidade genética intraespecífica.

REFERÊNCIAS

- Agostinho A. A. & Júlio-Júnior H. F. (1996). Ameaça ecológica, peixes de outras águas. *Revista Ciência Hoje* **124**, 36-44.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C. & Latini, J. D. (2004). Fisheries management in Brazilian reservoirs: lessons from/for South America. *Interciência* **29**, 334-338.
- Agostinho, A. A., Pelicice, F. M. & Gomes, L. C. (2008). Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 1119-132
- Avise, J. C. (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London* **265**, 1707–1712.
- Baumgartner, M. S. T. (1995). Distribuição de larvas de corvina *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Sciaenidae) e sua relação com alguns fatores ambientais na planície de inundação do alto rio Paraná-Brasil. Dissertação de Mestrado, não publicada, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.
- Boeger, W.A. & Kritsky, D.C. (2003) Parasites, fossils and geologic history: historical biogeography of the South American freshwater croakers, *Plagioscion* spp. (Teleostei, Sciaenidae). *Zoologica Scripta*, 32, 3–11.
- Campbell, K. E., Frailey, C. D. & Romero-Pittman, L. (2006) The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239, 166–219.
- Casatti, L. (2003). Sciaenidae (Drums or croakers). In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. Jr., eds), pp. 599-602. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Casatti, L. (2005). Revision of the South American freshwater genus *Plagioscion* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). *Revista Zootaxa* **1080**, 39-64.
- Chow, S. & Ushiyama, H. (2004). Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Marine Biology* **123**, 39–45
- FishBase – [<http://www.fishbase.org/summary/Plagioscion-squamosissimus.html>]. Acessado em 12/02/2015.
- Cooke, G. M., Chao, N. L. & Beheregaray, L. B. (2012). Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). *Journal of Biogeography* **39**, 724–738.
- Corrigan, S., Huvneers, C., Schwartz, T. S., Harcourt R. G. & Beheregaray, L. B. (2008). Genetic and reproductive evidence for two species of ornate wobbegong shark *Orectolobus* spp. on the Australian east coast. *Journal of Fish Biology* **73**, 1662–1675.

Dammannagoda, S. T., Hurwood, D. A. & Mather, P. B. (2008) Evidence for fine geographical scale heterogeneity in gene frequencies in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the north Indian Ocean around Sri Lanka. *Fish Research* **90**, 147–157.

Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Fontenele, O. & Peixoto, J. T. (1978). Análise dos resultados de introdução da pescada do Piauí, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), nos açudes do Nordeste. *Boletim Técnico DNOCS* **36**, 85-112.

Grant, W. S. & Bowen, B. W. (1998). Shallow populations histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* **89**, 415-426.

Hahn, N. S., Agostinho, A. A. & Goiten, R. (1997). Feeding ecology of corvina *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) in the Itaipu Reservior and Porto Rico Floodplain. *Acta Limnologica Brasiliensia* **1**, 11-22.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensives analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452

Liu, Z. J. & Cordes, J. F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1–37.

Lovejoy, N. R., Albert, J. S. & Crampton, W.G.R. (2006) Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, **21**, 5–13.

Lundberg, J. C. (1998) *The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. Phylogeny and classification of Neotropical fishes* (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucene, Z.M.S., and Lucena, Z.M.S., ed.), pp. 49–70. Edipucrs, Porto Alegre.

Monesi, N., Jacobs-Lorena, L. & Paço-Larson, M. L. (1998). DNA puff BhC4-1 gene from *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107**, 559–569

Monsch, K. A. (1998) Miocene fish faunas from the northwestern Amazonia basin (Colombia, Peru, Brazil) with evidence of marine incursions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **143**, 31–50.

Panarari-Antunes, R. S., Prioli, A. J., Prioli, S. M. A. P., Gomes, V. N., Julio, H. F. Jr., Agostinho, C. S., Silva Filho, J. P., Boni, T. A. & Prioli L. M. (2012) Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in Neotropical regions. *Journal of Fish Biology* **80**, 2434-2447.

Petrere, M. Jr., Agostinho, A. A., Okada, E. K. & Júlio, H. F. Jr. (2002). Review of the fisheries in the Brazilian portion of the Paraná/Pantanal basin. In: *Management and Ecology*

of *Lake and Reservoir Fisheries* (Cowx, I. G., ed.), pp. 123–143, Oxford: Fishing News Books.

Reis, R.E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr, C. J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Editora da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Ruiz, W. B. G. (2009). Cinco espécies novas de *Microglanis* (Siluriformes : pseudopimelodidae) da bacia do Tocantins-Araguaia, Brasil, com um catálogo das espécies de peixes da Bacia. Dissertação de mestrado, não publicada, Universidade Estadual de Londrina – Londrina, Brasil.

Santos, M. E. C. & Carvalho, M. S. S. (2004). *Paleontologia das bacias do Parnaíba, Grajaú e São Luís*. Rio de Janeiro: CPRM-Serviço Geológico do Brasil/DIEGIG/DEPAT. [<http://www.cprm.gov.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=680&sid=94>]. Acessado em 12/02/2015.

Santos, R. A., Mandelli Junior, J., Camara, J. J. C. & Campos, E. C. (1995). Dinâmica da nutrição da “pescada do Piauí”, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes), na represa de Ibitinga, rio Tietê, estado de São Paulo, Brasil. *Boletim Instituto de Pesca* **22**, 25-31.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013). Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725 – 2729.

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* **22**, 4673-4680.

Torloni, C. E. C., Santos, J. J., Carvalho, A. A., Correa, A. R. A. (1993). A pescada-do-piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da CESP – Companhia Energética de São Paulo. *Série Pesquisa e Desenvolvimento* **84**, 1-23, 1993.

Torres, R. A. (2006). Molecular taxonomy of *Plagioscion* Heckel (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **23**, 1235-1242.

Vergara-Chen, C., Aguirre, W. E., González-Wanguemert, M. & Bermingham, E. (2009). A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the *Cynoscion* group (Pisces: Sciaenidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution* **53**, 602–607.

ANEXO 2

Journal of fish biology

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. *Journal of Fish Biology* welcomes research manuscripts containing new biological insight into any aspect of fish biology. We invite papers that report results and ideas of value to fish biology that will serve a wide international readership. Hence the novelty of the content of manuscripts should have relevance beyond a particular species or place in which the work was carried out. **All material submitted must be original and unpublished, and not under consideration for publication elsewhere.** If in doubt about overlap, please give details of any related work submitted or in press when submitting your manuscript. The *Journal* uses plagiarism detection software, so in submitting your manuscript you accept that it may be screened against previously published literature.

The Fisheries Society of the British Isles (FSBI) considers that scientists should avoid research threatening the conservation status of any species of fish, which is already regarded as threatened according to the IUCN Red List of Threatened Species and the associated Red List Categories and Criteria version 3.1 (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria>) or which is listed as such in a Red Data Book appropriate to the geographic area concerned. In accordance with this view, papers based on such research will not be accepted, unless the work had clear conservation objectives.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu/).

2. **Submission of manuscripts.** We will consider: Regular papers (original research), Review papers, which will either be invited or agreed with an Associate Editor (see 17), Brief Communications (see 18), Letters (see 19), and Comments and Replies (see 20). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on submissions and authorship in *Journal of Fish Biology* **79**, 1-2 (2011) (available here)

Manuscripts are submitted online at <http://jfb.edmgr.com>, where a user ID and password are assigned on the first visit. Full instructions and support are available on this site. **Authors are expected to suggest potential referees**, selected internationally, for their manuscripts in the 'Suggest Reviewers' section.

3. **Preparation of manuscripts.** Authors should consult a recent issue of Journal of Fish Biology for details of style and presentation. **If their manuscript does not follow the format of the Journal, it will be returned to them unreviewed.** Manuscripts must be **double-spaced throughout**, all pages must be numbered and **line numbering set to continuous**, including tables, figure legends and reference lists. **Use a font size ≥ 12 . Do not save files in PDF (portable document format) format.**

The first page must contain the following information: the title of the paper, name(s) (initials ONLY for forenames) and FULL academic address(es) of ALL author(s); if the address of any author has changed, it should be added as a footnote. Telephone number and email address for the corresponding author (**one only**) should be provided as a footnote. A concise running headline of not more than 45 characters inclusive of spaces should also be given on this page. For regular papers arrange sections in the following sequence: Title page (as a separate page), Abstract and Key Words (as a separate page), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (**a combined Results and Discussion is not acceptable and Conclusions as a heading is only acceptable in Review Papers**), Acknowledgements (for individuals use initials only for forenames and no titles), References, Tables (with captions; see 6 below), Figure captions, Figures and Appendices. Within sections, subdivisions should not normally exceed two grades; decimal number classification of headings and subheadings should not be used (see recent past issues). Footnotes should not be used except in Tables. Spelling must be U.K. English, e.g. Concise Oxford English Dictionary (as distinct from American English) throughout, except in quotations and references. All Latin words (but excluding scientific words other than genus and species) should be in italics. **Do not write text in the first person.**

Do not duplicate information in tables and figures, or *vice versa* or in text and figures. Do not repeat table headings and figure legends in the text. Punctuation should be consistent and only a single space inserted between words and after punctuation. **Do not indicate positions of tables and figures in the text.** Two blank lines should be left after headings and between paragraphs. Text should be typed without end of line hyphenation, except for compound words. Lower case 'l' for '1' or 'O' for '0' should not be used.

4. **Abstract.** This must be concise and summarize **only** the significant findings of the paper (*i.e.* not the background or methods). It should be followed by a list of ≤ 6 **key words or key phrases that are not included in the title, with a maximum of 100 characters (including punctuation and spacing).**

5. **Illustrations.** Photographs should be selected only to illustrate something that cannot adequately be displayed in any other manner. Magnification should be given in actual terms and all stains used should be described in full. Colour figures can be included; the first two will be produced free of charge, additional figures will be produced online free of charge, print production will be at the author's expense. Authors must complete a Colour Work Agreement Form for any colour figures requiring payment. This will be indicated on acceptance. The form can be downloaded as a PDF from the home page at <http://jfb.edmgr.com>, or by clicking [here](#) Please note that the Colour Work Agreement Form must be returned by post to the address provided on acceptance. Number figures consecutively using Arabic numerals [Fig. 1, 2, *etc.*: subdivide by (a), (b), *etc.*], in order of their mention in the text. A fully descriptive caption must be provided for every figure and the complete list of captions typed together on a separate page. Captions must not be included on the figures. All relevant information, *e.g.* keys to the symbols and formulae, should be included in the caption. The minimum reduction for the figures may be indicated.

Artwork should be received in digital format. Line artwork (vector graphics) should be saved as Encapsulated PostScript (EPS) and bitmap files (half-tones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF). Native file formats should not be submitted. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

6. **Tables.** Number consecutively in Roman numerals (Table I, II, *etc.*), **in the order of their mention in the text.** Captions for tables should be **typed directly above each table**, not on a separate page. Footnotes to tables should be indicated by superscripts and typed at the bottom of the tables. Tables and figures must 'stand alone' and so all abbreviations must be defined in the figure captions and as footnotes in the tables. Tables, figures and figure captions should be saved in separate files from the main text of the manuscript. Tables should not be embedded in the text file in picture format.

7. **Units and symbols.** Use metric units. Physical measurements should be in accordance with the Système International d'Unités (SI), *e.g.* mm, mm³, s, g, µg, m s⁻¹, g l⁻¹. Use joules not calories. Authors will find the following two publications helpful: *British Standard 1991: Part I: 1967 Recommendations for Letter Symbols, Signs and Abbreviations and Units, Symbols and Abbreviations. A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* (Baron, D.N., ed.) published by the Royal Society of Medicine, London.

In mathematical expressions, single letters (italics) should be used for variables, qualifying them with subscripts (not italics) if required, e.g. length L, fork length L_F, standard length L_S,

index I , gonado-somatic index I_G , hepato-somatic index I_H , etc. The 24 hour clock should be used for time of day, *e.g.* 1435 hours, not 2.35 p.m. Calendar dates should be as, *e.g.* 15 June 1998. In the text, one-digit numbers should be spelt out unless they are used with units of measure (in which case they should not be hyphenated), *e.g.* five boxes, 5 cm. Numerals should be used for all numbers of two or more digits, *e.g.* 34 boxes. Use mass(es) rather than weight(s). Means and error (S.D., S.E., 95% C.L., *etc.*), should be to the same number of decimal places. Salinity is dimensionless with no units; do not use psu, ‰ or similar.

8. **Statistics.** Present statistics as follows: name of test, test statistic with associated degrees of freedom (d.f.; note that an F -distribution has TWO d.f. values) and probability level (P). If data conform to all the assumptions of the statistical method used, precise P -values can be given, otherwise P -values should be >0.05 , 0.05, 0.01 and 0.001. The P -values given by statistical packages assume that all the assumptions of the statistical method are fully met. Although ANOVA and regression are robust, the real P -values are likely to be different from the values printed by the package, because of violations of the assumptions. Provide confidence intervals (95% C.I.) for parameters estimated by ANOVA and regression analysis. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on reporting statistical results in *Journal of Fish Biology* **78**, 697-699 (2011) (available here)

9. **Species nomenclature.** On first mention of a species name in the main text, the common name of the species, if one is available, followed by the scientific species name (Latin binomial name, in italics) with the describing authority and date of authorship must be given. The common name should not be separated from the scientific name by a comma nor should the species name be in parentheses. The describing authority and date of authorship should not be separated by a comma. For example: the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792); NOT, the rainbow trout, [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)]. First use of species names in the title and Abstract should include common and scientific names as above, but do not require the describing authority and date of authorship.

Use standard sources for species common names, including: Wheeler, A. (1992). A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **41** (Supplement A) (for British fishes); Wheeler, A.C., Merrett, N.R. & Quigley, D.T.G. (2004). Additional records and notes for Wheeler's (1992) *List of the Common and Scientific Names of Fishes of the British Isles*. *Journal of Fish Biology* **65**, Supplement B (for British fishes); Nelson, J.S., Crossman, E.J., Espinosa-Pérez, H., Findley, L.T., Gilbert, C.R., Lea, R.N. & Williams, J.D. (2004). *Common and scientific names of fishes from the United States, Canada, and Mexico*. Committee on Names of Fishes. 6th edn. Bethesda, MD, U.S.A.:

American Fisheries Society (for North American fishes; except those covered above for British fishes); Froese, R. & Pauly, D. (Eds) (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org; *FAO Guides for Fisheries Purposes*.

When first using scientific species names the describing authority name appears in parentheses only if the binomial combination of the name has changed since the original description. *Oncorhynchus clarkii* (Richardson 1836) for example, includes the authority name in parentheses because Richardson initially described the species in the genus *Salmo*, under the name *Salmo clarkia*, whereas the name *Salmo marmoratus* Cuvier 1829 is currently recognized exactly as originally named by Cuvier. When the describing authority is Linnaeus, this should be abbreviated to L., e.g. *Cyprinus carpio* L. 1758. The citation for the original description of a species should not be included in the References unless additional specific details (*i.e.* more than just the species name) supplied by that publication are discussed in the manuscript. Use the online *Catalog of Fishes* as the standard authority for species nomenclature and date of description: Eschmeyer, W. N. (Ed.) *Catalog of Fishes* electronic version (5 January

2011). <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> After initial use of the species' common and scientific names, subsequent reference to the species should use the scientific name (without describing author or date) NOT the common name. The genus name should be abbreviated to a single letter (*e.g.* *C. carpio* and *O. mykiss*), except at the start of a sentence or where confusion may arise from multiple genera with the same first letter.

When listing synonyms for a species, the following style is required [based in part on Mincarone & Fernholm *Journal of Fish Biology* (2010) **77**, 779–801]:

Eptatretus cirrhatus (Forster 1801)

Homea banksii Fleming 1822: 375 (original description; type locality: South Seas; holotype: unknown)

Bdellostoma heptatrema Müller 1836: 79 (original description; type locality: South seas; holotype: unknown)

Bdellostoma forsteri Müller 1836: 80 (original description; type locality: Queen Charlotte Sound, New Zealand; holotype: unknown). Conel, 1931: 76 *Bdellostoma forsteri* var. *heptatrema*. Müller, 1838: 174 (new combination)

Bdellostoma cirrhatum. Günther, 1870: 511 (in part). Hutton, 1872: 87 (in part). Putnam, 1874: 160 (in part). Günther, 1880: 27

(Note that species names that are modifications of an existing binomial, rather than an original description, are separated from the author name by a full stop, *Bdellostoma cirrhatum*.)

Günther, 1870: 511 (in part).

The plural ‘fish’ should be used for the same species, ‘fishes’ for more than one species. Any specimens used for taxonomic analyses should, wherever possible, be deposited in appropriate scientific collections (*e.g.* museums and university collections, or private collections when there is good evidence that these are adequately maintained), with identifying catalogue numbers, so that they are accessible to the scientific community for subsequent examination and taxonomic revision. **Namebearing type specimens of taxa that are described in the *Journal of Fish Biology* as new to science must be deposited in recognized national or international institutions that can meet Recommendations 72F.1-5 of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999; available here) for institutional responsibility.** The chosen institute for deposition of name-bearing type specimens should be able to meet these responsibilities into the foreseeable future. A paratype series may be distributed among more than one recognized national or international institution at the discretion of the authors. This is encouraged for paratype series that include numerous specimens, where the paratype series can be split into two or more representative samples, comprising several specimens that are deposited at different institutions. For examples of recognized national or international institutions see earlier taxonomic publications in the *Journal of Fish Biology*, or check institutions listed in Eschmeyer’s *Catalog of Fishes Online* (available here), and see Poss & Collette, *Copeia* **1995**, 48- 70, for U.S. and Canadian institutions. Institutional abbreviations used in manuscripts should follow standard code designations as given in Eschmeyer’s *Catalog of Fishes Online* (see link above). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available here)

10. **Genetic nomenclature.** The *Journal* uses the zebrafish system (see <http://zfin.org/zfinfo/nomen.html>) for genes and proteins of fish origin. Genes should be in italic lower case text and proteins in non-italic lower case text with the first letter capitalized. If the genes and proteins are of human origin, use the human nomenclature, with genes in upper case italic text and proteins in upper case non-italic text. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available here)

11. **Sequence data.** Manuscripts containing novel amino acid sequences (*e.g.* primer sequences) will only be accepted if they carry an International Nucleotide Sequence Databases (INSD) accession number from the European Biology Laboratory (EMBL), GenBank Data Libraries (GenBank) or DNA Data Bank of Japan (DDBJ). The *Journal of*

Fish Biology strongly recommends that when authors deposit data in genetic data banks they include specimen catalogue numbers (for specimens preserved in collections), a note identifying sequences that are derived from type specimens (see 9) and collection locality data. The data base accession number must be given in the Materials and Methods section of the manuscript. For taxonomic papers that refer to sequences derived from specimens preserved in collections (see 9), authors should include a table that clearly links each sequence accession number with the specimen from which it was derived. Sequences from type specimens should also be clearly identified in this Table (*e.g. given in bold text*). A nomenclature for genetic sequences for type and some non-type specimens has been proposed by Chakrabarty *et al.* (2013) [Chakrabarty, P., Warren, M., Page, L., Baldwin, C. (2013). GenSeq: An updated nomenclature for genetic sequences and a formal ranking of sequences from type and non-type sources. *Zookeys* **346**, 29–41, doi: 10.3897/zookeys.346.5753] and may be used (but is not obligatory): sequences from holotypes are identified as genseq-1, paratypes genseq-2, those from topotypes are genseq-3, and the genetic marker(s) used are incorporated into the nomenclature (*e.g. genseq-2 ND2*). Lengthy nucleotide sequences will only be published in the text if, in the judgement of the Editor-in-Chief, these results are of general interest and importance. **Where sequences are already published, reference to the original source will suffice.**

12. **RAPD.** Data derived by RAPDs (randomly amplified polymorphic DNAs) technology are frequently not satisfactory and conclusions derived from them unreliable. Papers submitted to the *Journal* should not include data generated by this technique.

13. **Acknowledgement of copyright.** Authors should obtain permission from the copyright owner (usually this is the publisher) to use any figure, table or extended quotation from material that has previously been published. Acknowledgements, however, should cite the author: ‘Reproduced with permission from Einstein (1975)’.

14. **References.**

The list of references should be arranged alphabetically according to the surname of the first author and set out as follows:

Boisvert, C. A. (2005). The pelvic fin and girdle of *Panderichthys* and the origin of tetrapod locomotion. *Nature* **438**, 1145–1147.

Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T. & Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. In *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 30 (Pederson, R. A. & Schatten, G., eds), pp. 103–145. San Diego, CA: Academic Press.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

It is important to include the article's Digital Object Identifier (DOI) (see section 24) in the reference as volume and page information is not always available for articles published online. Please note the following example:

Song, J., Mathieu, A., Soper, R. F. & Popper, A. N. (2006). Structure of the inner ear of bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Fish Biology* **68**, 1767–1781.doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01057.x

The order in the list should be:

- (i). Single authors. Where more than one reference is given for a single author the publications should be listed chronologically.
- (ii). Two authors. These should be arranged first alphabetically, then chronologically. For text citations, use the names of both authors and the year. Do not use *et al.* for two-author references.
- (iii). Three or more authors. These should be arranged chronologically. For all text citations, use the surname of the first author only, followed by *et al.* and the date.

If more than one reference by the same author(s) published in the same year is cited, use *a, b, etc.* after the year in both text and list, *e.g.* (1963*a*). Text citations can be given in either of two ways: (a) with date in parentheses, 'as demonstrated by Jones (1956)'; (b) with names and date in parentheses, 'according to recent findings (Jones, 1956)'. **Where more than one reference is cited in the text these should be in chronological order, e.g.** Smith, 1975; Arnold, 1981; Jones, 1988. **Journal titles must be given in full.** Provide names and initials of **all** authors, the full title of the paper, the volume number and the page numbers.. **Authors should check that all citations in the text are in the list of references and vice versa**, and that their dates match. Journal titles, book titles and any other material within the reference list which will be italicized in print should be italicized or underlined in the manuscript.

References must be available in the public domain, *e.g.* 'do not include grey' literature.

List electronic references separately, under the heading **Electronic References**, and set out as follows:

ICES (2001). Report of the Northern Pelagic and Blue Whiting Fisheries Working Group. *ICES CM 2001/ACFM:17*. Available at <http://www.ices.dk/reports/acfm/2001/wgnpbw/wgnpbw01.pdf> (last accessed 6 April 2010).

All articles on Wiley Online Library (<http://wileyonlinelibrary.com>) include full details on how to cite the article.

15. **Supporting Information.** As a service to authors and readers, the *Journal of Fish Biology* will host supporting information online. Supporting Information files are hosted by the Publisher in the format supplied by the author and are not copy-edited by the Publisher. **It is the responsibility of the author to supply Supporting Information in an appropriate file format and to ensure that it is accurate and correct. Authors should therefore prepare Supporting Information with the same rigour as their main paper, including adherence to journal style (e.g. formatting of references).** Supporting Information can be provided as separate files or as one combined file. Authors are discouraged from supplying very large files or files in non-standard file formats, both of which may reduce their use to the readership. Files should be prepared without line numbers or wide line spacing, and with all track-change edits accepted. Supporting Information files containing videos and animations are accepted.

16. **Ethics.** Contributors to the *Journal of Fish Biology* must read the Editorials on ethics in *Journal of Fish Biology* **68**, 1-2 (2006) (available here) and *Journal of Fish Biology* **78**, 393-394 (2011) (available here). They will be required to complete a questionnaire on submission of their paper, available for downloading here.

17. **Reviews.** Reviews should be concise, critical and creative. They should seek to stimulate topical debate and new research initiatives. Prospective authors are asked to submit a synopsis (two pages maximum) of their paper to an Associate Editor. The Editor-in-Chief can be consulted to advise on the appropriate Associate Editor to be approached. The synopsis should outline why the review is topical, its main points and objectives, and how it will stimulate debate and research. When the proposal has been accepted by an Associate Editor, he or she will invite the author to submit a manuscript, following the Instructions for Authors, within an agreed time limit.

18. **Brief Communications.** A Brief Communication may be concerned with any subject within the scope of the *Journal of Fish Biology* but should be **confined to a single point or issue of progress**, such as an unusual occurrence, an interesting observation, or a topical and timely finding. The manuscript must, however, have some relevance beyond the species or locality under consideration. To qualify for inclusion as a Brief Communication a paper **must be short (five printed pages maximum; c. 2500 words)**. An abstract of not more than three sentences is required. **No subheadings or subdivisions should be included.** In other respects submitted manuscripts should comply with the instructions given above.

19. **Letters.** These must be very short (one and a half printed pages maximum; c. 750 words) and deal with single significant finding or point for discussion that needs rapid publication. Include title page, key words (note no Abstract), main text and references (maximum four) (no tables or figures).

20. **Occasional Comments.** Comments concerning recent published papers in the *Journal* may be considered by the Editor-in-Chief. The comments will be sent to the original authors to provide an opportunity for reply. Publication of the Comment and Reply will end the debate.

21. **Acceptance of papers.** Papers will normally be critically reviewed by two or more independent experts in the relevant discipline and evaluated for publication by the Editors, but the Editors may return to authors without review any manuscripts deemed to be of inadequate quality or inappropriate for the *Journal of Fish Biology*. The final decision to accept a paper will be made by the Editor-in-Chief.

22. **Copyright and Online Open**

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that, if it is accepted for publication, the licence to publish the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the FSBI. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. **Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.**

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

24. Proofs and offprints. Proofs are downloaded as a PDF file from a designated web site. Full details will be sent to the corresponding author by email. Therefore, a working email address must be provided. Proofs should be returned to the Managing Editor within 3 days of receipt. Free access to the final PDF offprint of the article will be available *via* author services only. Authors must therefore sign up for author services to access the article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. In addition to this electronic offprint, paper offprints may be ordered online. Full instructions for ordering paper offprints will be sent with the proofs. Any queries regarding offprints should be emailed to: offprint@cosprinters.com. Paper offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive; however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive.

25. Early View. *Journal of Fish Biology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final, and no changes can be made after online publication. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Early View articles lack a volume, an issue and page numbers, and cannot be cited in the traditional way. Instead they have a DOI, which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

26. Author material archive policy. Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material 2 months after publication. If

the return of any submitted material is required, the Managing Editor or Production Editor must be informed as soon as possible.

27. *Queries*. Contact the Managing Editor at journaloffishbiology@btconnect.com.